

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA EMANOELLI ARAÚJO DE ASSIS

**PERFIS GENÉTICOS E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE
Escherichia coli DIARREOGÊNICAS e *Salmonella* spp ISOLADAS NO ESTADO
DO PARANÁ**

Curitiba

2016

FLÁVIA EMANOELLI ARAÚJO DE ASSIS

**PERFIS GENÉTICOS E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE
Escherichia coli DIARREOGÊNICAS e *Salmonella* spp ISOLADAS NO ESTADO
DO PARANÁ**

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Análises Clínicas, Departamento de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Cyntia M. T. Fadel Picheth

Curitiba
2016

Assis, Flávia Emanoelli Araújo de

Perfis genéticos e resistência a antimicrobianos de estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas e *Salmonella* spp isoladas no estado do Paraná / Flávia Emanoelli Araújo de Assis – Curitiba, 2016.
92 f.: il. (algumas color.); 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Tipagem molecular. 2. *Salmonella*. 3. *Escherichia coli* diarreogênicas. 3. PFGE. 4. Filogenia. I. Picheth, Cyntia Maria Telles Fadel. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.927

TERMO DE APROVAÇÃO

FLÁVIA EMANOELLI ARAÚJO DE ASSIS

Título: **"PERFIS GENÉTICOS E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ESTIRPES DE *Escherichia coli* DIARREOGÊNICAS e *Salmonella* spp ISOLADAS NO ESTADO DO PARANÁ"**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Prof^a. Dr^a. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth
Orientadora


Dr^a. Vivian Rotuno Moure
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Wesley Máuricio de Souza
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Sérgio Luiz Bach
Universidade Tuiuti do Paraná

Curitiba, 17 de junho de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu companheiro de vida, de jornada e de sonhos, Izaias, e à minha preciosa filha recém-nascida, Kaline, que iluminou o caminho da minha vida.

Aos meus pais, Josafá e Marlene, que foram meu escudo e meus ajudadores em toda minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus por sempre me guardar e por iluminar o meu caminho, colocando ao meu lado pessoas especiais, que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente.

Agradeço ao meu esposo Izaias pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão. À minha mãe Marlene e meu pai Josafá pelo amor, carinho, paciência e por sempre estarem presentes e torcendo por minhas conquistas. Agradeço aos meus irmãos Denys e Mileny por estarem sempre ao meu lado compartilhando das minhas realizações.

Especialmente à minha orientadora Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth agradeço pela orientação, pelo apoio e disponibilidade na realização deste trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pela confiança depositada.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Clínica: Cibelle, Karol, Isabel Priscila e Mônica, por compartilharem conhecimentos e pelo auxílio no dia-a-dia, pelo companheirismo, amizade e pelas sugestões construtivas neste trabalho.

Agradeço à CAPES-REUNI pela bolsa concedida durante o curso.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt).

RESUMO

As doenças diarreicas são um problema de saúde pública e uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. *Salmonella* e *Escherichia coli* diarreogênicas (DEC) estão entre as principais causas de diarreia. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar geneticamente e determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos de estirpes de *Salmonella* e DEC isoladas no estado do Paraná. As amostras foram isoladas de culturas de fezes de pacientes envolvidos em surtos ou casos esporádicos de diarreia, sendo composta por 46 estirpes de *Salmonella* identificadas bioquimicamente e 66 estirpes de DEC incluindo 38 *E. coli* enteropatogênicas atípicas (aEPEC), 19 *E. coli* enteroagregativas (EAEC), 4 *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), 3 *E. coli* de aderência difusa (DAEC), 1 *E. coli* enteropatogênica (tEPEC) e 1 *E. coli* enteroinvasora (EIEC) previamente caracterizadas através de PCR. As estirpes de *Salmonella* foram analisadas por PCR para a identificação do gênero e sorotipagem molecular. A subtipagem foi realizada através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e amplificação de múltiplos *loci* de fagos (MAPLT). As DEC foram analisadas utilizando PFGE, PCR-Multiplex para a determinação do grupo filogenético e quanto à presença de 10 genes adicionais de virulência. O perfil de resistência aos antimicrobianos foi determinado pelo método de disco-difusão. As 46 estirpes de *Salmonella* foram molecularmente confirmadas quanto ao gênero e classificadas nos sorotipos Enteritidis (33 estirpes) ou Typhimurium (13 estirpes). A PFGE revelou um elevado coeficiente de similaridade (94,6%) entre *Salmonella* Enteritidis, e o perfil denominado PA/P1 foi compartilhado por 27 (81,8%) dessas estirpes. Duas estirpes de *Salmonella* Typhimurium foram não tipáveis por PFGE. As 11 restantes produziram 8 perfis de PFGE e 3 de MAPLT, indicando maior diversidade entre as bactérias deste sorotipo. Resistência a um ou mais antimicrobianos foi observada em 42 (91,3%) das estirpes, sendo resistência ao ácido nalidíxico a mais comum (39 estirpes, 84,8%). Os resultados indicam que *Salmonella* Enteritidis é o sorotipo predominante no estado do Paraná, e o perfil PA/P1/MI/R1 o mais frequentemente associado com casos esporádicos de diarreia e envolvido com 7 de 9 surtos notificados. O poder discriminatório do MAPLT foi menor que da PFGE. Entre os isolados de *E. coli* uma estirpe de EAEC foi não tipável por PFGE e 59 perfis distintos foram observados entre as 65 DEC remanescentes. Apenas 2 perfis de PFGE foram compartilhados entre aEPEC e 2 entre EAEC. Quanto à filogenia 23 (34,8%) estirpes foram classificadas no grupo B2, 19 (28,8%) no grupo A, 14 (21,2%) no grupo D e 10 (15,2%) no grupo B1. A presença de um ou mais genes adicionais de virulência foi detectada em 57 (86,4%) DEC sendo *astA* (47%), que codifica a toxina termoestável de EAEC1, e a adesina *iha* (34,8%) os mais frequentes. O gene codificador da citotoxina subtilase (*subAB*) não foi detectado em nenhuma das estirpes. Resistência a um ou mais antimicrobianos foi observada entre 45 (68,2%) estirpes sendo a resistência à ampicilina a mais frequente (51,5%) e 14 estirpes apresentaram multirresistência. Este trabalho traz informações importantes para a epidemiologia das doenças diarreicas na região.

Palavras-chaves: Tipagem molecular, *Salmonella*, *Escherichia coli* diarreogênicas, PFGE, Filogenia.

ABSTRACT

Diarrheal diseases are a major public health problem and a major cause of morbidity and mortality worldwide. *Salmonella* and diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) are among the main causes of diarrhea. The objectives of this study were to characterize genetically and determine the resistance profile to antimicrobials of *Salmonella* and DEC isolated in Paraná state. The samples were isolated from stool cultures of patients involved in outbreaks and sporadic cases of diarrhea, consisting of 46 *Salmonella* strains identified biochemically, and 66 strains DEC including 38 atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC), 19 enteroaggregative *E. coli* (EAEC), 4 *E. coli* Shiga toxin producing (STEC), 3 diffuse adherence *E. coli* (DAEC), 1 enteropathogenic *E. coli* (tEPEC) and 1 enteroinvasive *E. coli* (EIEC) previously characterized by PCR. *Salmonella* strains were analyzed by PCR to identify the genus and for molecular serotyping. Subtyping was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multiple amplification of phage loci typing (MAPLT). DEC were analyzed using PFGE, PCR-Multiplex for determining the phylogenetic group, and for the presence of 10 additional virulence genes. The antimicrobial resistance profile was determined by disk diffusion method. The 46 strains of *Salmonella* were molecularly confirmed regarding the genus and classified in serotypes Enteritidis (33 strains) or Typhimurium (13 strains). PFGE revealed a high similarity coefficient (94.6%) among *Salmonella* Enteritidis, and the pattern PA / P1 was shared by 27 (81.8%) of these strains. Two *Salmonella* Typhimurium strains were non-typeable by PFGE. The remaining 11 produced 8 PFGE pattern and 3 MAPLT, indicating greater diversity among bacteria of this serotype. Resistance to one or more antimicrobials was observed in 42 (91.3%) of the strains, with resistance to nalidixic acid being the most common (39 strains, 84.8%). Results indicate that *Salmonella* Enteritidis is the serotype predominant in Paraná state, and the profile PA / P1 / M1 was the most often associated with sporadic cases of diarrhea and involved in 7 of 9 reported outbreaks. The discriminatory power of MAPLT was lower than the PFGE. Among *E. coli* isolates, 1 EAEC strain was not typeable by PFGE and 59 different profiles were observed among the 65 DEC remaining. Only 2 PFGE profiles were shared between aEPEC and 2 between EAEC. In regard to phylogeny, 23 (34.8%) strains were classified as B2, 19 (28.8%) in group A, 14 (21.2%) in group D and 10 (15.2%) in group B1. The presence of one or more additional virulence genes was detected in 57 (86.4%) DEC; *astA* (47%) encoding the heat-stable toxin EAEC1 and *iha* adhesin (34.8%) were more frequent. The gene encoding the subtilase cytotoxin (*subAB*) was not detected in any of the strains. Resistance to one or more antibiotics was observed in 45 (68.2%) strains, ampicillin resistance was the most common (51.5%); 14 strains showed multidrug resistance. This study provides important information for the epidemiology of diarrheal diseases in the region.

Keywords: molecular typing, *Salmonella*, diarrheagenic *Escherichia coli*, PFGE, phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESQUEMA DE PATOGENICIDADE DOS PATOTIPOS DE <i>E.coli</i> DIARREOGÊNICAS.....	17
FIGURA 2 – CIDADES DO ESTADO DO PARANÁ NAS QUAIS FORAM ENCONTRADAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA DEC E <i>Salmonella</i>	32
FIGURA 3 – ÁRVORE PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE <i>Escherichia coli</i>	37
FIGURA 4 – PERFIS REPRESENTATIVOS DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA OBTIDA POR PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella</i> E OS SOROTIPOS Enteritidis E Typhimurium	47
FIGURA 5 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Salmonella</i> Enteritidis E <i>Salmonella</i> Typhimurium UTILIZANDO A ENZIMA <i>Xba</i> I NA PFGE	51
FIGURA 6 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Salmonella</i> Enteritidis E <i>Salmonella</i> Typhimurium UTILIZANDO A ENZIMA <i>Avr</i> II NA PFGE.	52
FIGURA 7 – GÉIS REPRESENTATIVOS DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE <i>LOC</i> I NA SUBTIPAGEM POR MAPLT	53
FIGURA 8 – RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Salmonella</i> COMO DETERMINADO POR MAPLT	54
GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DOS 9 SURTOS DE DIARREIA CAUSADOS POR <i>Salmonella</i> NOTIFICADOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2010 E 2013.....	55
FIGURA 9 – PERFIS REPRESENTATIVOS DA PCR TRIPLEX PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO OBSERVADOS PARA DEC.....	56
GRÁFICO 2 – GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM aEPEC	58
GRÁFICO 3 – GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM EAEC	58
GRÁFICO 4 – GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM STEC E DAEC	59
FIGURA 10 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> DIARREOGÊNICAS.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1–	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS AMPLICONS DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO E SOROTIPOS DE <i>Salmonella</i>	35
TABELA 2–	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS AMPLICONS NA TIPAGEM DE <i>Salmonella</i> POR MAPLT.....	36
TABELA 3–	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS, CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO E TAMANHO DOS AMPLICONS DA PCR PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE DEC	37
TABELA 4–	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS, PROPRIEDADES E TAMANHO DOS AMPLICONS PARA A DETECÇÃO DOS GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA DE <i>E.coli</i> DIARREOGÊNICAS	39
TABELA 5–	PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR PARA <i>nleE</i>	40
TABELA 6–	PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR PARA O GENE <i>efa1/lifA</i>	40
TABELA 7–	PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR PARA O GENE <i>astA</i>	41
TABELA 8–	PROGRAMA UTILIZADO NA PCR PARA O GENE <i>pic</i>	41
TABELA 9–	PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR GENE <i>katP</i>	41
TABELA 10–	PADRÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE <i>Salmonella</i>	49
TABELA 11–	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS POR PATOTIPO DAS ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> DIARREOGÊNICAS	56
TABELA 12–	DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA POR PATOTIPO DE DEC	57
TABELA 13–	PADRÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> DIARREOGÊNICAS	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	– Aderência agregativa
A/E	– Lesão do tipo <i>attaching and effacing</i>
aEPEC	– <i>E.coli</i> enteropatogênica atípica
BFP	– <i>Bundle-forming pilus</i>
cAMP	– Adenosina monofosfato cíclico
CF	– Fator de colonização fibrilar
CFA	– Antígeno de fator de colonização
cGMP	– Guanosina monofosfato cíclico
CLB	– Tampão de lise celular
CS	– Antígeno de superfície de <i>E. coli</i>
CSB	– Tampão de suspensão celular
CT	– Toxina colérica
pCVD432	– Plasmídio de aderência agregativa
DA	– Aderência difusa
DAEC	– <i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DEC	– <i>Escherichia coli</i> diarreogênica
dNTP	– Desoxiribonucleotídeo trifosfatado
EAEC	– <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST 1	– Toxina termo-estável de <i>E. coli</i> enteroagregativa ¹
EAF	– Fator de aderência de EPEC
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
Efa1	– Fator de aderência de <i>EHEC</i>
EIEC	– <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EHEC	– <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	– <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	– <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
HeLa	– Células de carcinoma cervical humano
HEp-2	– Células de carcinoma de laringe
LA	– Aderência localizada
LEE	– <i>Locus of enterocyte effacement</i>
LifA	– Fator inibidor de linfócitos

LT	– Toxina termolábil
MAPLT	– Amplificação de múltiplos loci de fagos
pAA	– Plasmídio de aderência agregativa
pb	– Pares de bases
PCF	– Provável fator de colonização
PCR	– <i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	– Eletroforese em gel em campo pulsado
pmol	– Picomol
pInv	– Plasmídio de virulência de EIEC/ <i>Shigella</i>
SSTT	– Sistema de secreção do tipo três
STEC	– <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
ST	– Toxina termoestável
Stx	– Toxina Shiga
Stx1	– Toxina Shiga tipo 1
Stx2	– Toxina Shiga tipo 2
tEPEC	– <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	<i>Escherichia coli</i>	15
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	18
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica típica e <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica atípica	20
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> Produtora de Toxina Shiga (STEC)	21
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC)	23
2.1.4	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora (EIEC)	24
2.1.5	<i>Escherichia coli</i> que adere Difusamente (DAEC)	25
2.1.6	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	26
2.2	<i>Salmonella</i>	27
2.3	TIPAGEM MOLECULAR	29
2.4	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	AMOSTRA	32
4.1.1	Isolados de <i>Salmonella</i> spp	33
4.1.2	Isolados de <i>Escherichia coli</i> diarreogênicas	33
4.1.3	Estirpes utilizadas como controle	33
4.2	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	34
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA	34
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>Salmonella</i>	34
4.5	DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	35
4.6	SUBTIPAGEM MOLECULAR POR AMPLIFICAÇÃO DE MÚLTIPLOS LOCI DE FAGOS (MAPLT)	35
4.7	DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE <i>E.coli</i> DIARREOGÊNCIAS	36

4.8	DETECÇÃO DE GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM <i>E. coli</i> DIARREOGÊNICAS	38
4.9	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	41
4.10	ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)	42
4.10.1	Preparo dos <i>Plugs</i>	43
4.10.2	Lise celular nos plugs de agarose	43
4.10.3	Lavagem dos <i>plug</i>	44
4.10.4	Digestão do DNA imobilizado	44
4.10.5	Condições de eletroforese	44
4.10.6	Análise dos géis.....	45
4.10.7	Índice discriminatório	45
5	RESULTADOS	47
5.1	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>Salmonella</i>	47
5.2	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Salmonella</i> ...	48
5.3	DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DE <i>Salmonella</i> POR PFGE	50
5.4	DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DE <i>Salmonella</i> POR MAPLT	53
5.5	DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE DEC.....	55
5.6	DETECÇÃO DOS GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA DE DEC.....	57
5.7	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PARA DEC	59
5.8	DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DE DEC POR PFGE	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO 1- TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	87

1 INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas são um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo ^{1; 2}. A diarreia é responsável pela morte de 1 em cada 9 crianças no mundo todo ³ provocando a morte de cerca de 2.000 crianças por dia, impacto maior que a da AIDS, malária e sarampo combinados ⁴.

Estudos epidemiológicos revelam que os agentes bacterianos mais comumente associados com diarreia são as linhagens diarreogênicas de *Escherichia coli* (DEC), *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Campylobacter jejuni* ^{5; 6; 7}.

Os patotipos diarreogênicos de *Escherichia coli* lideram como causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento além de causar diarreia do viajante e ser uma causa emergente de diarreia nos países industrializados ^{8; 9}. As DEC atualmente são classificadas em 7 categorias principais: *E. coli* enteropatogênica (típica – tEPEC; atípica - aEPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) ^{10; 11}. Cada um desses patotipos tem características distintas relacionadas à genética, epidemiologia, patogênese, manifestações clínicas e tratamento ¹².

A virulência é uma característica multifatorial e além dos marcadores de virulência específicos de cada patotipo, outros fatores de virulência podem estar associados com a patogênese das DEC. Os genes que codificam os fatores de virulência podem estar localizados no cromossomo, em ilhas de virulência e também em elementos genéticos móveis como plasmídeos, fagos e transposons, o que pode levar à transmissão horizontal dessas características entre as bactérias¹³. As estirpes de DEC podem conter diversos fatores associados com virulência tais como adesinas, que são fundamentais para o estabelecimento da bactéria no hospedeiro, enzimas, toxinas, entre outros que contribuem para a patogênese ¹⁴.

A infecção por *Salmonella* em humanos e animais continua a ser um problema de saúde pública preocupante em todo o mundo. Estirpes de *Salmonella* estão entre os mais importantes patógenos transmitidos por alimentos, levando a milhões de casos de diarreia e liderando como a principal causa de surtos da doença no mundo todo. *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis e

S. enterica subesp. *enterica* sorovar Typhimurium são os principais sorotipos de *Salmonella* isolados atualmente ^{15; 16; 17; 18; 19}.

O estudo de doenças infecciosas inclui questões de transmissibilidade e análise epidemiológica. Com base na investigação epidemiológica, os riscos para a saúde pública podem ser determinados e intervenções na propagação da doença podem ser concebidas ^{20; 21}.

Nas infecções de origem bacteriana a identificação dos isolados frequentemente é realizada através de análises fenotípicas como a biotipagem, resistência a antimicrobianos, sorotipagem, entre outras. Tais metodologias são também utilizadas como base para análises epidemiológicas. No entanto, com o avanço da biologia molecular tornou-se cada vez mais claro que as características fenotípicas são somente a expressão do genótipo, estando sujeitas a modificações, enquanto que a análise molecular permite uma discriminação melhor e mais confiável. Desta forma os métodos moleculares começaram a ser aplicados em áreas clinicamente relevantes incluindo as análises epidemiológicas ²¹.

Salmonella e DEC são causas importantes de gastroenterite no Brasil ^{5; 22; 23; 24}, mas ainda há poucos estudos epidemiológicos, baseados em métodos moleculares realizados no país ^{25; 26; 27; 28; 29}.

Com a finalidade de colaborar para o estabelecimento de métodos mais sensíveis para a subtipagem de *E.coli* diarreogênicas e *Salmonella* spp no Paraná e confirmar surtos de diarreia causados por estes micro-organismos, este trabalho visa aplicar métodos de epidemiologia molecular para o estudo desses patógenos e determinar o seu perfil de resistência a antimicrobianos. Além disso, considerando a crescente associação de *E.coli* diarreogênicas em casos de diarreia no estado do Paraná, este trabalho também visa caracterizar essas estirpes de DEC quanto à presença de genes de adicionais de virulência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cerca de 1,7 bilhões de casos de diarreia ocorrem a cada ano envolvendo surtos e casos esporádicos da doença e afetando adultos e crianças^{30; 31}. Diarreia é uma das principais causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade e é responsável pela morte de aproximadamente 760.000 crianças a cada ano. É também a principal causa de desnutrição causando um impacto negativo sobre o crescimento e desenvolvimento cognitivo das crianças^{3; 4; 30}. As diarreias são transmitidas principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados com enteropatógenos³⁰.

No Brasil, de acordo com dados coletados pelo Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2015 houve 10.666 surtos de doença diarreica notificados envolvendo 209.240 pessoas. Os principais agentes etiológicos identificados associados a esses surtos foram *Salmonella* spp e *E.coli*. No entanto a Organização Mundial da Saúde estima que, anualmente, mais de um terço da população mundial adoeça devido a surtos de doenças transmitidas por alimentos e somente uma pequena proporção é notificada. Portanto, a ocorrência de surtos pode ser muito maior^{32; 33}.

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é a bactéria anaeróbia facultativa encontrada em maior número na microbiota intestinal, onde é benéfica para o hospedeiro^{10; 13}. Este organismo faz parte da família *Enterobacteriaceae*, composta por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores de glucose. Desenvolve-se bem em meios de cultura utilizados na rotina laboratorial como MacConkey e Teague³⁴.

No entanto vários clones de *E. coli* adquiriram fatores específicos de virulência e desenvolveram a capacidade de causar um amplo espectro de doenças em humanos, estas são classificadas como *E.coli* patogênicas extra intestinais e *E.coli* diarreogênicas (DEC)^{13; 35}.

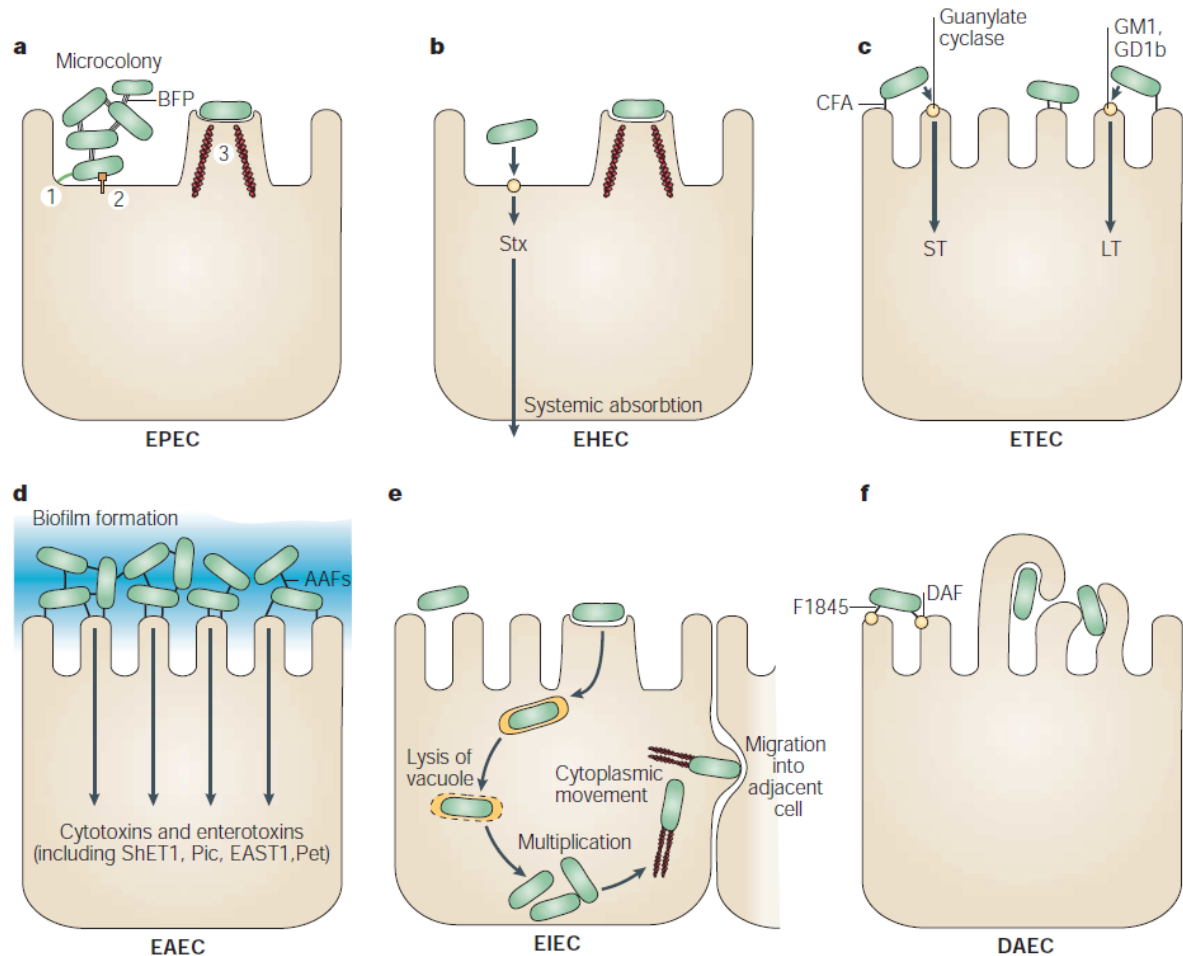
As estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos principais denominados A, B1, B2 e D. As estirpes virulentas extra intestinais pertencem principalmente ao grupo B2 e em menor grau ao grupo D enquanto que a

maioria das estirpes comensais pertence ao grupo A ^{36; 37}. As DEC tem sido encontradas nos 4 grupos filogenéticos ^{38; 39; 40; 41}.

O tamanho do genoma varia entre os grupos filogenéticos, sendo que cepas dos grupos A e B1 têm o genoma menor que os grupos B2 e D ⁴². Os isolados também diferem de acordo com seus nichos ecológicos e presença de determinados fatores de virulência. Com isso, estirpes dos grupos B2 e D não são frequentemente encontradas em amostras ambientais ⁴³. Já isolados de peixes, anfíbios, répteis e as amostras ambientais são geralmente classificadas nos grupos A ou B1 ⁴⁴.

A determinação dos grupos filogenéticos pode ser realizada utilizando técnicas como eletroforese de enzima multilocus (MLEE), ribotipagem, polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP), tipagem de sequência multilocus (MLST) e reação em cadeia da polimerase. No entanto a metodologia mais utilizada na atualidade é a PCR, com destaque para a PCR triplex proposta por Clermont, Bonacorsi e Bingen ⁴⁵. Esta é uma forma mais rápida e simples para classificação dos isolados de *E. coli* nos diferentes grupos filogenéticos através da detecção dos genes *chuA*, cujo produto é requerido para transporte de heme, *yjaA* cujo produto está envolvido na resposta ao estresse de *E.coli* frente ao peróxido de hidrogênio, cádmio e ácidos e na formação de biofilme, e do fragmento de DNA *TSPE4.C2* que supostamente faz parte do gene que codifica para uma lipase esterase ^{46; 47; 48}.

As estirpes de *E.coli* que causam diarreia em humanos podem ser divididas em sete grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica típica (tEPEC), *E.coli* enteropatogênica atípica (aEPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) ^{10; 13; 34}. A FIGURA 1 representa os patotipos de DEC, seus principais marcadores de virulência e esquemas de patogenicidade, que serão apresentados no texto a seguir.

FIGURA 1 - ESQUEMA DE PATOGENICIDADE DOS PATOTIPOS DE *E.coli* DIARREOGENICAS

FONTE: KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, v. 2, n. 2, p. 123-40, 2004; adaptado e traduzido com permissão de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Microbiology], copyright (2004).

LEGENDA: **a)** EPEC adere aos enterócitos do intestino delgado, afeta a estrutura normal das microvilosidades induzindo a lesão característica *attaching* e *effacing* (A/E). Desarranjos no citoesqueleto são acompanhados por uma resposta inflamatória e diarreia. 1. Adesão inicial, 2. Translocação de proteína pelo sistema de secreção do tipo III, 3. Formação de pedestal. **b)** EHEC também induz a lesão do tipo A/E, mas no cólon. O fator diferencial de EHEC é a elaboração de toxinas Shiga (Stx) cuja absorção sistêmica leva a complicações potencialmente fatais. **c)** ETEC adere aos enterócitos do intestino delgado e induz diarreia aquosa pela secreção das enterotoxinas termolábil (LT) e/ou termoestável (ST). **d)** EAEC adere ao epitélio do intestino delgado e grosso em um espesso biofilme, elabora e secreta enterotoxinas e citotoxinas. **e)** EIEC invade as células do colon, lisa o fagossomo e move-se através da célula pela nucleação de filamentos de actina. A bactéria também pode se mover lateralmente através do epitélio pela propagação direta célula-célula ou pode sair e voltar a entrar pela membrana plasmática basolateral. **f)** DAEC induz um efeito de transdução de sinal característico nos enterócitos que se manifesta como o crescimento de projeções celulares que envolvem a bactéria aderente. AAF, fímbria de aderência agregativa; BFP, *bundle-forming pilus*; CFA, antígeno de fator de colonização; DAF, fator de aceleração do decaimento; EAST1, toxina termoestável de EAEC 1; ShET1, enterotoxina 1 de *Shigella*.

A identificação de estirpes diarreogênicas de *E. coli* exige a sua diferenciação dos membros não patogênicos que compõem a microbiota intestinal, o que não é possível através dos métodos microbiológicos convencionais¹⁰. Assim, a

identificação destas estirpes centrou-se cada vez mais na detecção de características que determinam a virulência dessas bactérias, ou dos genes que as codificam e que sirvam como marcadores moleculares ⁴⁹. A diferenciação desses patótipos pode requerer ensaios de adesão em células HEp-2 ou HeLa, testes de citotoxicidade, ensaios imunológicos, ensaios de hibridização de DNA e/ou PCR para detectar a presença de genes que codificam proteínas associadas com essas características ^{10; 50}.

Atualmente métodos moleculares tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros ensaios moleculares têm sido extensivamente utilizados para detectar os genes de virulência marcadores de *E. coli* envolvidas em infecções gastrointestinais ⁵⁰. Além dos genes marcadores de cada patótipo, outros genes de virulência podem estar associados com a patogênese de DEC.

2.1.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro patótipo de *E. coli* a ser descrito, identificado sorologicamente e associado com casos de diarreia em crianças, sendo a adesão um dos seus principais fatores de patogenicidade ⁴⁹.

Os principais sintomas clínicos da infecção causada por EPEC são diarreia aquosa acompanhada de febre, mal-estar e vômitos. Essas bactérias causam doença primariamente em crianças menores de 2 anos de idade. A provável explicação para a razão da resistência relativa de adultos e crianças mais velhas à infecção causada por EPEC é a perda de receptores específicos reconhecidos pela bactéria e o desenvolvimento de imunidade ^{10; 51}.

As estirpes de EPEC produzem um padrão de adesão característico, denominado de aderência localizada, em células Hep-2 ou HeLa ^{13; 52}. Neste modelo, as bactérias se ligam a áreas localizadas na superfície celular, formando microcolônias compactas (*clusters* bacterianos) que podem ser visualizadas 3 horas após o contato das bactérias com as células. Esse fenômeno está associado à presença do plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) ¹⁰ que codifica 2 operons relacionados com virulência, *bfp* e *perABC*. O último codifica reguladores requeridos para expressão de ambos os operons bem como do regulador Ler da ilha de patogenicidade LEE presente no cromossomo. O operon *bfp* codifica os genes

necessários para a biossíntese do pílus BFP que interconecta as bactérias formando microcolônias no epitélio do intestino delgado e promove a sua estabilização^{10; 14; 51; 53}.

O principal mecanismo da patogênese de EPEC é a lesão *attaching and effacing* (A/E). Esta é caracterizada pela aderência íntima da bactéria à superfície das células epiteliais, seguida de destruição das microvilosidades, formação de pedestal e agregação polarizada de moléculas de α -actina, bem como de outros componentes do citoesqueleto situados abaixo do sítio de adesão, devido ao aumento dos níveis de cálcio intracelular e de proteína quinase C (FIGURA 1- a)^{10; 13; 54}.

O desenvolvimento da lesão A/E depende da expressão de vários genes localizados em uma região de 35 kb do cromossomo de EPEC, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). LEE é uma ilha de patogenicidade que contém vários genes associados com virulência, entre eles o gene *eae* que codifica para a intimina, uma proteína necessária para a adesão íntima da bactéria à célula hospedeira e o desenvolvimento da lesão e o gene que codifica Tir, proteína translocada através do sistema de secreção do tipo III e inserida na membrana da célula hospedeira onde funciona como receptor para a intimina^{10; 55; 56; 57; 58}.

Além dos fatores de virulência codificados pelo plasmídio EAF e pela ilha de patogenicidade LEE, as EPEC podem expressar outros fatores codificados em regiões cromossômicas externas à LEE. Diversas proteínas efetoras não codificadas por LEE (*nle*) foram descritas em estirpes de EPEC e *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) dentre elas, as proteínas NleB e NleE e a toxina multifuncional Efa1/LifA^{59; 51; 60; 61}.

NleE e NleB são codificadas pelos genes *nleB* e *nleE* respectivamente e fazem parte do mesmo operon^{62; 63; 64}. Essas proteínas são injetadas nas células intestinais através do sistema de secreção do tipo três (SSTT) que transfere proteínas do citoplasma da bactéria diretamente para o citoplasma da célula hospedeira, onde irão provocar diversos efeitos associados com a patogenicidade^{65; 66}. As proteínas NleE e NleB estão envolvidas na diminuição da resposta imune do hospedeiro. NleE suprime a ativação de p65 do fator transcricional NF-kB, do núcleo da célula hospedeira enquanto que NleB bloqueia a translocação da subunidade p65 do fator transcricional NF-kB. A inibição de NF-kB está associada com o decréscimo

da expressão de citocinas pró inflamatórias (IL-8, TNF- α e IL-6) no epitélio intestinal infectado o que contribui para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro ^{61; 67; 68}.

A linfoestatina denominada LifA (*lymphocyte inhibitory fator*), produto do gene *lifA*, que induz uma profunda supressão da ativação de linfócitos humanos foi descrita em EPEC ⁶⁹. Simultaneamente o gene *efa1* (*EHEC fator for adherence*) que codifica para uma adesina foi descrito em EHEC sorotipo O111:H- ⁷⁰. Os genes que codificam para Efa1 e LifA são virtualmente idênticos possuindo 99,9% de identidade na sequência de nucleotídeos e são atualmente reconhecidos como *efa1/lifA* ^{69; 71}.

O produto do gene *efa1/lifA* (Linfoestatina/EFA-1) é considerada uma grande toxina multifuncional e é expressa em várias bactérias patogênicas gram negativas. Linfoestatina/EFA-1 apresenta a habilidade de inibir a proliferação de linfócitos humanos, a síntese de IL-2, IL-4, IL-5 e interferon gama e também foi descrita sua participação na ligação e colonização do intestino ^{69; 71; 72; 73; 74; 75}.

2.1.1.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica típica e *Escherichia coli* Enteropatogênica atípica

As EPEC são classificadas em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC). As estirpes de EPEC são consideradas típicas se possuem os genes *eae* e *bfp*. As EPEC atípicas possuem o gene *eae*, mas não contem *bfp* ^{10; 11; 13; 76}.

O plasmídeo EAF não é essencial para a formação das lesões do tipo A/E, mas evidências indicam que *bfp* desempenha um papel na adesão à célula hospedeira aumentando a eficiência da formação da lesão ^{55; 76; 77}.

As EPEC típicas correspondem aos sorotipos clássicos de EPEC como O55:NM, O55:H6 e O111:NM. Este patotipo foi uma das principais causas de diarreia persistente em crianças de países em desenvolvimento. No entanto, na última década tem sido observada uma queda na frequência de casos de diarreia causados por tEPEC, o que foi acompanhado da emergência e número crescente de casos provocados pelas EPEC atípicas, tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento ^{35; 76}. Estudos mostram que as aEPEC estão associadas com diarreias agudas prolongadas que podem durar em média 14 dias ^{78; 79}. As estirpes de tEPEC e aEPEC também diferem no padrão de aderência. Enquanto as tEPEC

mostram somente o padrão de aderência localizada (LA), as aEPEC podem apresentar padrão de aderência denominado LA-like (LAL), caracterizado por micro colônias menos compactas e menos densas que as LA, padrão de aderência difusa (DA), ou o padrão de aderência agregativa (AA) ^{80; 81; 82; 83}.

2.1.2 *Escherichia coli* Produtora de Toxina Shiga (STEC)

E.coli produtoras de toxina Shiga (STEC) foram reconhecidas em 1982 quando foram isoladas de pessoas envolvidas em surtos de diarreia sanguinolenta associada com a ingestão de hambúrgueres mal cozidos em *fast foods* e também de casos esporádicos de síndrome urêmica hemolítica ^{84; 85}. Na ocasião *E. coli* sorotipo O157:H7, até então raramente isolado de humanos, foi associada com o surto e denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) devida aos sintomas causados. Posteriormente foi mostrado que essas bactérias provocavam um efeito citopático irreversível em culturas de células Vero, o que levou à denominação *E. coli* Verotoxigênica (VTEC), e HeLa ^{85; 86} que podia ser neutralizado com antitoxina preparada contra a toxina de *Shigella dysenteriae* 1 ^{10; 86}. A caracterização da toxina levou por fim à designação *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que engloba outros sorotipos além do O157:H7 ⁵¹.

As STEC são identificadas pela produção de uma potente toxina denominada toxina Shiga ⁸⁷. Esta toxina é o principal fator de virulência dessas bactérias que podem provocar desde diarreia não complicada a complicações graves como colite hemorrágica, púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) e síndrome urêmica hemolítica (SUH), podendo ser fatal ^{10; 85; 88; 89}.

Existem dois tipos principais dessas toxinas, que são denominadas toxina Shiga1 (Stx1) e toxina Shiga 2 (Stx2). Toxina Shiga 1 é 98% homóloga à toxina Stx produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 enquanto Stx2 apresenta homologia em torno de 60% com Stx1 e é antigenicamente diferente ^{10; 13; 87; 90}. Além das toxinas Stx1 e Stx2 as STEC podem apresentar outros fatores de virulência que estão distribuídos de forma heterogênea entre as estirpes e que podem influenciar sua virulência ¹³. Dentre eles destaca-se a intimina, também presente em tEPEC e aEPEC. Os subgrupos de STEC que contém a ilha de patogenicidade LEE que codifica a intimina são denominados frequentemente como EHEC, termo utilizado

para designar estirpes mais virulentas, e também são capazes de causar lesões *attaching and effacing* (FIGURA 1- b) ^{10; 51}.

Outra toxina identificada em algumas estirpes de STEC é a citotoxina subtilase (SubAB) pertence a uma família de toxinas AB₅ produzidas principalmente por um subgrupo de STEC mais virulentas ⁹¹. Esta citotoxina é codificada por dois genes cotranscritos (*subA* e *subB*) localizados no plasmídeo de virulência, designado pO113. A subunidade A é uma serina protease semelhante à subtilase e a citotoxicidade para células eucarióticas é devida a uma clivagem altamente específica de BiP/GRP78, uma família essencial de chaperonas Hsp70 localizada no retículo endoplasmático (RE). Essas chaperonas têm como função guiar o dobramento correto das proteínas no RE além de regular a sinalização de resposta ao estresse no RE. Assim, a clivagem de BiP pela toxina desencadeia sérias consequências para a sobrevivência da célula ^{91; 92}.

A subunidade B tem especificidade para terminais glicanos no ácido siálico N-acetilmurâmico. Seu papel na patogênese da doença em humanos ainda não está estabelecido, mas sabe-se que SubAB é letal para camundongos provocando danos microvasculares, trombose e necrose em múltiplos órgãos, incluindo cérebro, rins e fígado ⁹².

Além disso, a enterohemolisina, citotoxina que apresenta atividade citolítica tanto em células humanas como células animais também foi descrita em algumas STEC. Esta toxina causa lise de eritrócitos, liberando a hemoglobina e consequentemente ferro, necessário para o crescimento bacteriano ⁹³.

A produção de enterohemolisina por STEC tem sido associada com doenças de maior severidade. No entanto, a maneira como ela participa na patogênese de STEC ainda não é bem compreendida ⁹⁴, mas parece contribuir para o desenvolvimento de síndrome urêmica hemolítica ⁵¹. A enterohemolisina é codificada pelo gene *ehxA*, também denominado EHEC-*hlyA*, presente em um plasmídeo encontrado em quase todas as STEC O157:H7 e amplamente distribuído entre as STEC não O157 ^{95; 96; 97}.

Outro gene de origem plasmidial é o *katP* localizado no plasmídeo pO157 presente em algumas estirpes de STEC que codifica uma enzima bifuncional catalase-peroxidase denominada KatP ⁹⁸. A produção dessa enzima que degrada peróxidos contribui para a colonização bacteriana no intestino por ajudá-la no escape das defesas do hospedeiro ^{98; 99; 100}.

O gene *iha* codifica para uma adesina (Iha) homóloga à IrgA de *Vibrio cholerae*. Iha é uma proteína de membrana externa (OMP), descrita inicialmente em STEC O157:H7 e parece ser importante para o desenvolvimento da doença. O papel de Iha na colonização intestinal de humanos e animais ainda não é bem compreendido, mas estudos mostram que a mutação no gene *iha* de EHEC provoca o decréscimo na colonização intestinal em modelo animal ^{101; 102; 103}. Além de STEC, o gene *iha* também foi detectado nos patótipos aEPEC e EAEC ^{104; 105}.

2.1.3 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC são uma importante causa de diarreia nos países em desenvolvimento e são a principal causa da “diarreia do viajante” ^{34; 106; 107}.

Estas bactérias estão distribuídas numa grande variedade de sorogrupos, que abrangem pelo menos 78 grupos O e 34 H. Os sorogrupos O mais comuns são O6, O8, O15, O20, O25, O27, O49, O63, O78, O128, O148, O153, O159, O167 e O169, sendo os grupos O e H mais fortemente associados O8:H9, O78:H12 e O25:H42 ^{34; 108}.

As ETEC são caracterizadas pela produção de uma ou ambas as toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). Uma ou ambas as toxinas podem ser expressas ¹⁰⁹ (FIGURA 1- c) ^{9; 10; 13; 109}. A colonização do intestino por ETEC é mediada por uma ou mais proteínas fimbriais ou fatores de colonização fibrilares (CFs) que são denominados CFA (antígenos de fator de colonização), CS (antígeno de superfície de coli) ou PCF (provável fator de colonização) seguidos por um número. Mais de 20 CFAs foram caracterizados e a maioria das ETEC isoladas de humanos expressa CFA/I, CFA/II ou CFA/IV ^{9; 13}. Os genes das CFAs usualmente são codificados em plasmídeos, que também codificam as enterotoxinas ST e LT ¹⁰.

Após a colonização do intestino delgado as ETEC liberam as toxinas ^{13; 110}. LT, codificada pelo gene *lt*, é uma toxina do tipo AB₅ (1 subunidade do tipo A e 5 subunidades do tipo B) intimamente relacionada em estrutura e função com a enterotoxina colérica de *Vibrio cholerae*. Existem 2 grupos principais de LT, LT-I e LT-II, que diferem nas propriedades imunes e na afinidade das subunidades B aos receptores. Geralmente LT-I está associada com doenças em humanos ⁵¹. O mecanismo de ação de LT inclui a ligação das subunidades B₅ aos receptores gangliosídios GM1 na superfície da célula hospedeira e a internalização da

subunidade A catalítica que ADP-ribosila G_{sa} inibindo a sua atividade de GTPase e aumentando os níveis de cAMP. Isso resulta na perda de flúidos e eletrólitos na luz intestinal.^{9; 13; 51; 109; 111}.

As toxinas ST são divididas em duas classes: STa (também chamada de ST-I) e STb, que diferem em estrutura e mecanismos de ação. As toxinas ST de ambas as classes são codificadas pelos genes *st* encontrados predominantemente em plasmídeos e alguns em transposons^{9; 10}. Praticamente só as toxinas da classe STa estão associadas com doença em humanos¹³.

A toxina STa liberada no intestino delgado causa aumento dos níveis de cGMP nas células hospedeiras levando à secreção de cloreto e fluido na luz intestinal^{13; 14}, o que tem sido considerado como a causa da diarreia aquosa. No entanto, estudos *in vivo* realizados em ratos sugerem que a diarreia causada por ST pode ser devida ao comprometimento da absorção de fluidos^{51; 112}.

2.1.4 *Escherichia coli* Enteroinvasora (EIEC)

EIEC são intimamente relacionadas à *Shigella* spp quanto ao perfil bioquímico, genético e patogênese, e compartilham fatores de virulência essenciais. Estudos genéticos mostram que *Shigella* e EIEC são taxonomicamente indistinguíveis ao nível de espécie, mas devido à importância do significado clínico da *Shigella* a distinção na nomenclatura ainda é mantida^{13; 113}.

A patogênese da EIEC é semelhante à de *Shigella* e inicia-se com a invasão das células epiteliais do intestino, seguida pela lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular e disseminação da bactéria nos enterócitos, levando à destruição dos mesmos (FIGURA 1- e)^{10; 13; 14; 114}.

Além da invasão e disseminação dentro das células epiteliais, que pode resultar em disenteria (fezes diarreicas com muco e sangue) EIEC e *Shigella* também produzem enterotoxinas secretoras que intensificam a diarreia¹¹⁵. Esses eventos podem provocar uma forte reação inflamatória que se manifesta como ulcerações intestinais^{10; 116}.

Embora as infecções com estirpes de EIEC possam resultar em colite inflamatória invasiva e disenteria, e evoluir para bacteremia em pacientes com

síndrome da imunodeficiência adquirida, na maioria das vezes essas bactérias causam apenas diarreia aquosa^{10; 116}.

A patogenicidade de EIEC e *Shigella* está em grande parte associada com a presença de um plasmídio de virulência denominado plnv, que contém os genes necessários para a invasão e disseminação bacteriana nas células do hospedeiro¹⁰. O plasmídio contém o *locus mxi-spa* que codifica o SSTT e proteínas efetoras Ipa (IpaA, ipaB, ipaC, ipaD e ipaH) que foram implicadas na reorganização do citoesqueleto para promover a captação e posterior escape da bactéria do fagossomo e apoptose em macrófagos. O gene *ipaH* (*invasion plasmid antigen*) é um gene multicópias presente tanto no plnv quanto no cromossomo, o qual é exclusivamente encontrado em *Shigella* e EIEC^{13; 117;10; 118}.

2.1.5 *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC)

O termo “*E.coli* que adere difusamente” foi inicialmente usado para se referir a qualquer estirpe de *E.coli* HEp-2 aderente que apresentava padrão de adesão distinto dos da EPEC (adesão localizada). Posteriormente DAEC foi reconhecida como uma categoria independente de *E.coli* potencialmente patogênica¹⁰ definido pelo padrão característico de adesão difusa às células HEp-2 bem como em células HeLa¹¹⁹. Estudos mostram que DAEC está associada particularmente à diarreia em crianças maiores de 12 anos de idade^{13; 119; 120}.

O padrão de adesão difusa apresentado pelas DAEC é mediado por adesinas codificadas por uma família de operons, que expressam adesinas fimbriais (F1845 e Dr) e não fimbriais (AfaE-I e AfaE III)¹²¹. A fímbria F1845 é codificada pelo gene *daaE* que pode estar presente tanto no cromossomo bacteriano como em plasmídeos^{13; 119}. Aproximadamente 75% das estirpes de DAEC produzem a fímbria de adesão F1845. Esta fímbria pertence à família Dr de adesinas, que usam DAF (uma proteína de membrana, que normalmente protege células de danos pelo sistema complemento) como receptor.

As DAEC induzem um efeito citopático caracterizado pelo desenvolvimento de extensões celulares longas que envolvem a bactéria aderente efeito este, desencadeado pela ligação da F1845 ao receptor DAF (FIGURA 1- f)¹³. Além deste efeito, essas estirpes de *E. coli* também são capazes de provocar reação

inflamatória nas células intestinais através da indução de secreção de IL-8, citocina capaz de estimular a migração de leucócitos polimorfonucleares ¹²².

2.1.6 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

EAEC foi reconhecida em 1987 ao ser isolada de uma criança chilena que apresentava diarreia persistente ¹²³. Este grupo de DEC é uma causa comum da diarreia do viajante e foi identificado como a causa de vários surtos de diarreia entre adultos e crianças em países desenvolvidos e em desenvolvimento ^{12; 124; 125}.

As EAEC são definidas pelo padrão de aderência agregativa (AA) às células HEp-2 caracterizado pela auto-aglutinação proeminente entre as bactérias na superfície celular, descrita como “tijolos empilhados” ^{10; 13; 124}.

Os plasmídeos de aderência agregativa (pAA) têm sido utilizados como marcadores em estudos epidemiológicos e para a identificação da EAEC. Estes plasmídeos codificam vários genes de virulência tais como as fimbrias de aderência agregativa (AAF-I e II) ¹²⁶, a toxina termoestável de *E. coli* enteroagregativa 1 (EAST-1) ¹²⁷ e o ativador transcricional AggR ¹²⁸. Entretanto a distribuição de fatores de virulência em EAEC é bastante heterogênea ¹⁰.

A patogênese da EAEC inicia-se com colonização da mucosa intestinal, através de fimbrias de aderência agregativa (AAFs), seguida pela estimulação da secreção de muco na célula hospedeira, aprisionando as bactérias em um biofilme predominantemente no cólon (FIGURA 1- d), o que pode impedir a absorção intestinal podendo provocar desnutrição principalmente em crianças. Além disso, esses patógenos podem secretar enterotoxinas e citotoxinas na mucosa intestinal que podem desencadear uma resposta inflamatória e diarreia secretória ^{51; 129; 130}.

O ativador transcricional AggR, codificado pelo gene *aggR*, é regulador de um conjunto de genes de virulência de EAEC incluindo os que codificam fatores de aderência agregativa, fimbrias AAF / I e AAF / II ¹²⁸, a proteína dispersina ¹³¹ e um grande aglomerado de genes de uma ilha de patogenicidade inserida no *locus* PheU ¹² e tem sido utilizado como marcador para este patotipo de *E. coli* ¹³². A presença do gene *aggR* caracteriza as EAEC típicas e a sua ausência, as EAEC atípicas ¹²⁶.

A enterotoxina termostável de *E.coli* enteroagregativa (EAST 1), codificada por um gene plasmidial (*astA*), foi a primeira toxina de EAEC a ser reconhecida e melhor caracterizada ¹¹¹. Embora esta toxina tenha 50% de similaridade com STa de

EPEC, elas são geneticamente e antigenicamente distintas. Acredita-se que EAST1 contribui para a diarreia aquosa por induzir o aumento de cGMP nas células intestinais levando à secreção de ânions e fluidos na luz intestinal. No entanto, o gene que codifica para EAST1 também pode ser encontrado em muitos isolados de *E. coli* comensais e, conseqüentemente, o papel dessa toxina na patogênese da diarreia permanece incerto ^{125; 129; 133}.

Entre os fatores de virulência de EAEC, as proteínas autotransportadoras tem um relevante papel na patogênese dessas bactérias. A proteína Pic é uma das proteínas autotransportadoras descritas. Ela é uma serina protease codificada pelo gene cromossomal *pic*, tem atividade de mucinase e está envolvida na colonização da mucosa intestinal e na indução da hipersecreção de muco ^{125; 134}. Além disso, essa proteína é capaz de causar hemaglutinação de eritrócitos ¹².

2.2 *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e está amplamente difundido na natureza (água, solo, animais e alimentos) devido a contaminação por fezes de indivíduos portadores ou doentes podendo infectar tanto o homem quanto os animais domésticos e selvagens ^{135; 136}.

De acordo com sistema usado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), taxonomicamente são reconhecidas duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* que compreende 6 subespécies: I (*Salmonella enterica* subesp. *enterica*), II (*Salmonella enterica* subesp. *salamae*), IIIa (*Salmonella enterica* subesp. *arizonae*), IIIb (*Salmonella enterica* subesp. *diarizonae*), IV (*Salmonella enterica* subesp. *houtenae*) e VI (*Salmonella enterica* subesp. *indica*); e *S. bongori* (V). Membros dessas sete subespécies podem ser sorotipadas em mais de 2500 diferentes sorovariedades de acordo com os antígenos somáticos (O) e flagelares (H) ^{136; 137; 138; 139}.

Cerca de 1500 dos 2500 sorotipos conhecidos pertencem a *S. enterica* subsp. *enterica* (I). Dentro dessa subespécie estão contidos cerca de 99,5% dos sorotipos mais comumente isolados. Além disso, as estirpes pertencentes a esses grupos causam aproximadamente 99% das infecções por *Salmonella* em humanos e animais de sangue quente ^{136; 137}.

Sorotipos de *S. enterica* subespécies II, IIIa, IIIb, IV e VI e *S. bongori* são geralmente isolados de animais de sangue frio e do ambiente, mas raramente de humanos ^{137; 140}.

A infecção por *Salmonella* em humanos e animais continua a ser um problema de saúde pública preocupante em todo o mundo. Estirpes de *Salmonella* estão entre os mais importantes patógenos transmitidos por alimentos, levando a milhões de casos de diarreia e surtos no mundo todo, sendo a espécie *S. enterica* a principal causa de surtos e casos esporádicos de diarreia em humanos ^{15; 16; 141; 142}. Estima-se que *Salmonella* cause 93,8 milhões de casos de gastroenterite mundialmente a cada ano resultando em 155,000 mortes ¹⁴¹.

Existem quatro formas de infecção por *Salmonella*: gastroenterite, sepse, febre entérica e colonização assintomática. A gastroenterite, que é o foco deste trabalho, é a forma mais comum de salmonelose, sendo os sorovares *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium as principais causas atualmente ^{15; 114; 143; 144}.

Os sintomas da infecção usualmente aparecem 6-48 horas após o contato e incluem febre, dor abdominal, diarreia (as fezes podem conter sangue, leucócitos e muco), náuseas e vômitos. A doença dura geralmente 4-7 dias e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento. No entanto, em crianças e idosos a antibioticoterapia pode ser necessária ^{143; 145}.

Alguns sorotipos como *Salmonella* Typhimurium tem um amplo espectro de hospedeiros, infectando uma grande variedade de animais. Outros como *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A são altamente adaptados a humanos e não causam doença em outros hospedeiros ¹⁴⁰.

O diagnóstico da infecção por *Salmonella* é crítico para a detecção e controle da doença. O diagnóstico clássico de *Salmonella* é baseado em métodos fenotípicos tais como a cultura, perfil bioquímico e tipagem sorológica ^{146; 147} que requer vários dias. Nos últimos anos, métodos para identificação baseados em PCR para os sorotipos mais relevantes de *Salmonella* foram desenvolvidos ^{148; 149; 150; 151}. Tais métodos podem oferecer uma alternativa efetiva à sorotipagem tradicional possibilitando um rápido diagnóstico, o que pode ter um significativo impacto no controle das doenças transmitidas por alimentos devido a essa bactéria ^{147; 152}.

2.3 TIPAGEM MOLECULAR

O estudo de doenças infecciosas inclui questões de transmissibilidade e análise epidemiológica. A investigação epidemiológica é fundamental para a saúde pública, e além da identificação dos patógenos fornece base para intervenções em relação à propagação da doença. Para as infecções de origem bacteriana, a identificação de isolados geralmente é realizada utilizando análises fenotípicas que também têm sido usadas como uma base para a avaliação epidemiológica^{20; 21}.

Com o avanço da biologia molecular tornou-se cada vez mais claro que as características fenotípicas são somente a expressão do genótipo de um organismo, cuja análise pode expressar melhor sua verdadeira identidade. Desta forma os métodos moleculares começaram a ser aplicados em áreas clinicamente relevantes incluindo as análises epidemiológicas²¹.

Tipagem é a identificação de diferentes tipos de organismos dentro de uma mesma espécie. A tipagem pode ser realizada utilizando métodos fenotípicos ou genotípicos. Os sistemas tradicionais de tipagem baseados no fenótipo tais como sorotipagem, biotipagem, fagotipagem ou antibiograma, têm sido utilizados por muitos anos. No entanto, métodos que examinam a relação de isolados ao nível molecular (tendo o material genético como alvo) revolucionaram a capacidade de diferenciação entre tipos bacterianos^{153; 154}.

Uma das metodologias amplamente utilizadas com o intuito de se discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie é a eletroforese em campo pulsado (PFGE). Para essa análise o DNA bacteriano total é digerido com enzimas de restrição que clivam o cromossomo em grandes fragmentos que são então separados em gel de agarose utilizando campos elétricos alternados em diferentes ângulos. A PFGE permite a separação de fragmentos de DNA de grande tamanho (acima de 20 kb e até cromossomos inteiros) o que não é possível com a eletroforese convencional. A separação ocorre com a alternância periódica de um campo elétrico direcionado de forma alternada. Desta forma as moléculas são permanentemente forçadas a modificar a orientação em que se movem e como as menores se orientam mais rapidamente em relação ao campo elétrico, migram mais rapidamente pelo gel^{152; 154; 155; 156}.

A eletroforese em campo pulsado é considerada como padrão ouro para subtipagem e continua a ser a técnica mais utilizada mundialmente na investigação

de surtos ^{147; 152; 154; 156}. Para subtipagem de *E. coli* e *Salmonella* há procedimentos padronizados pelo PulseNet ¹⁵⁷.

Recentemente, métodos alternativos têm sido desenvolvidos para subtipar os isolados de *Salmonella* como a amplificação randômica de DNA polimórfico (do inglês, random amplified polymorphic DNA; RAPD), análise de múltiplos locus de repetições em tandem de número variável (do inglês, multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis; MLVA) ^{147; 152; 158} e a tipagem molecular por amplificação de múltiplos loci de fagos (MAPLT) que é um ensaio baseado em PCR para a amplificação de sequências genômicas de fagos temperados de *Salmonella* ¹⁵⁹. O método foi testado com diferentes conjuntos de primers e mostrou um bom poder discriminatório para os sorotipos Typhimurium e Enteritidis de *Salmonella* e apresentou também bom potencial como uma ferramenta para estudos epidemiológicos ^{159; 160}.

2.4 JUSTIFICATIVA

Desde 2013 o Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Federal do Paraná vem se dedicando ao estudo de bactérias enteropatogênicas. Inicialmente voltado para pesquisa de STEC ¹⁶¹ e posteriormente incluindo as DEC ^{23; 24}. Estudos sobre tipagem de *Salmonella* foram iniciados em 2002 ¹⁶² e desde 2010 tem sido realizada a busca de DEC, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Aeromonas* spp, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio* spp e *Yersinia enterocolitica* em fezes diarreicas de adultos e crianças do estado no Paraná. Foi mostrado que *Salmonella* spp foi isolada predominantemente de surtos de diarreia enquanto que DEC e *Aeromonas* spp em casos esporádicos da doença. No entanto essas bactérias não foram caracterizadas utilizando técnicas de tipagem molecular.

Baseado na importância de *Salmonella* e DEC como agentes de diarreia e o impacto dos estudos epidemiológicos na definição das políticas e intervenções na saúde pública, é fundamental que esses patógenos sejam analisados através de metodologias que permitam distinguir os isolados pertencentes a uma mesma espécie/sorotipo e identificar eventuais clones associados com surtos da doença, ou mais virulentos, ou ainda multirresistentes e conhecer a diversidade genotípica e das estirpes circulantes no estado do Paraná.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil genético e de resistência aos antimicrobianos de estirpes de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* diarreogênicas isoladas no estado do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação molecular do gênero e principais sorotipos de *Salmonella*;
- Determinar os perfis de PFGE dos isolados de *Salmonella* spp;
- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados;
- Definir o número de clones (PFGE) de *Salmonella* spp e comparar com o perfil de resistência aos antimicrobianos;
- Subtipar estirpes de *Salmonella* utilizando a técnica de “tipagem de múltiplos loci de fagos (MAPLT)”;
- Determinar os perfis de PFGE dos isolados de *E.coli* diarreogênicas;
- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos das estirpes;
- Definir o número de clones (PFGE) e comparar com o perfil de resistência aos antimicrobianos;
- Determinar o grupo filogenético das estirpes de *E.coli* diarreogênicas;
- Verificar a presença de genes de virulência acessórios nas estirpes de *E.coli* diarreogênicas.

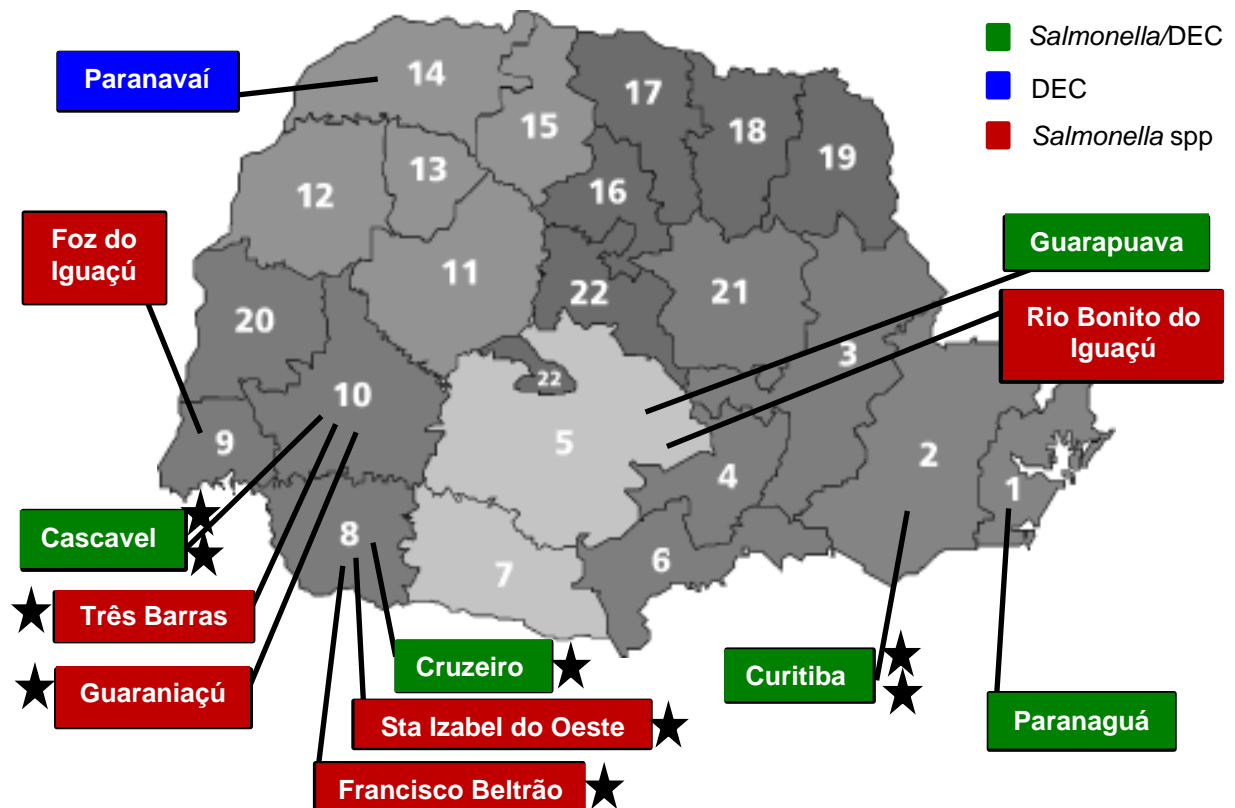
4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFPR (CEP: 320SM102.06.12, CAEE: 0053.0.091.000-06) (vide ANEXO 1).

4.1 AMOSTRA

A amostra foi composta por 46 estirpes de *Salmonella* spp e 66 estirpes de *E.coli* diarreogênicas isoladas de culturas fecais humanas de pacientes residentes em diversas cidades do estado do Paraná que estão indicadas na figura abaixo.

FIGURA 2 - CIDADES DO ESTADO DO PARANÁ NAS QUAIS FORAM ENCONTRADAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA DEC E *Salmonella*



FONTE: O autor, adaptação de LACEN PR, 2016¹⁶³.

LEGENDA: O sinal ★ ao lado do nome da cidade indica o número de surtos ocorridos na mesma.

4.1.1 Isolados de *Salmonella* spp

As estirpes de *Salmonella* foram isoladas de fezes diarreicas de adultos e crianças envolvidos em 9 surtos e em casos esporádicos de diarreia ocorridos em diversas cidades do estado do Paraná durante o período de junho de 2010 a maio de 2013 (FIGURA 2). As amostras foram fornecidas pelo Laboratório Central do Estado (LACEN-PR) e Laboratório Municipal de Curitiba nas quais as estirpes de *Salmonella* spp foram isoladas e identificadas através de métodos bioquímicos convencionais ¹⁴⁶. Parte das estirpes (33 isolados) foram sorotipadas, com a utilização de antisoros e identificadas como pertencentes ao sorotipo Enteritidis ²⁴.

4.1.2 Isolados de *Escherichia coli* diarreogênicas

As estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas foram isoladas de fezes diarreicas de adultos e crianças (53 estirpes) e também de pacientes controles saudáveis (13 estirpes) de diversas cidades do Paraná durante os períodos de março a outubro de 2007 ²³ e de junho de 2010 a janeiro de 2012 ²⁴. As 66 estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas foram identificadas utilizando o protocolo de PCR multiplex Fialho et al ²³ e incluem 38 aEPEC, 19 EAEC, 4 STEC, 3 DAEC, 1 tEPEC e 1 estirpe de EIEC.

4.1.3. Estirpes utilizadas como controle

E. coli EPEC 258FA ²⁴ e *Salmonella* sorotipos Typhimurium, Livingstone, Saint Paul, Newport, Muenster, London, Enteritidis, Javiana, Panama, Derby, Weltevreden, previamente sorotipadas no Laboratório de referência nacional Fundação Oswaldo Cruz, foram utilizadas como controles na identificação do gênero *Salmonella* dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium.

E. coli EPEC 258FA ²⁴ também foi utilizada como controle positivo para a amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2.

Foram utilizadas como controles positivos na detecção de genes adicionais de virulência em DEC as estirpes de STEC O157:H7 (*nleE*, *nleB*, *efa1/lifA*), 12 SF (*subAB*, *ehxA*), 103 SF (*iha*, *ehxA*, *katP*) e EAEC 2391 (*astA/ pic/ aggR*) ^{23; 164; 165}.

4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As bactérias foram mantidas em TSB/glicerol 20% a -20°C. Para reativação, as bactérias foram cultivadas em ágar MacConkey (Oxoid; Basingstoke, UK) e incubadas *overnight* a 35°C. Para a realização da PFGE as bactérias foram semeadas em ágar triptona de soja (TSA, Difco; Sparks MD, USA) e incubadas a 37°C por 14-16 horas.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As culturas realizadas em ágar MacConkey incubadas a 35°C durante 18-24 horas foram utilizadas para a extração de DNA utilizando o método de fervura¹⁶⁶. Cerca de cinco colônias isoladas foram coletadas com uma alça bacteriológica e transferidas para um tubo tipo Eppendorf, capacidade de 1,5 ml, contendo 500 µl de água destilada estéril. As suspensões foram fervidas por 10 minutos para liberação do DNA e então centrifugadas a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf modelo 5410) por 2 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e mantidos a -20°C até o momento da análise por PCR.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Salmonella*

Para a identificação molecular das estirpes de *Salmonella* foi utilizado o sistema de PCR desenvolvido por Alvarez et al¹⁴⁸ modificado para a identificação do gênero *Salmonella* e somente dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium. A PCR triplex foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão da Taq DNA Polimerase Máxima Hot Start® (Fermentas Life Sciences; Vilnius, LT) (10X), 1,5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1U da Taq DNA Polimerase Máxima Hot Start®, 1 µl de DNA e 10 pmol de cada um dos 3 pares de *primers* (sintetizados pela Invitrogen Waltham, USA) cujas sequências e tamanhos dos amplicons estão indicados na TABELA 1. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems®) programado para 1 ciclo a 95°C (2 minutos), 30 ciclos a 95°C (1 minuto), 57°C (1 minuto), 72°C (2 minutos) e um ciclo final a 72°C (5 minutos).

TABELA 1 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS AMPLICONS DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO E SOROTIPOS DE *Salmonella*

Primer	Gene	Sequência (5'→ 3')	Tamanho do Fragmento (pb)	Referência
OMPC (Gênero)	<i>ompC</i>	F-ATCGCTGACTTATGCAATCG R-CGGGTTGCGTTATAGGTCTG	204	148
ENT (Enteritidis)	<i>sdf I</i>	F-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG R-TGAACTACGTTTCGTTCTTCTGG	304	148
TYPH (Typhimurium)	<i>spy</i>	F-TTGTTCACTTTTACCCCTGAA R-CCCTGACAGCCGTTAGATATT	401	148

FONTE: O autor (2016).

Foram realizados no mínimo 2 experimentos independentes para cada estirpe.

4.5 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos das reações de PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% utilizando como tampão o Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X concentrado (preparado de TBE 5X contendo 0,44 M de Tris base, 0,45 M de ácido bórico e 0,01 M de EDTA [pH 8,3]). A separação eletroforética foi realizada a 38 V durante 2 horas. Os géis foram corados durante 15 minutos em solução de brometo de etídio 0,5 mg/ml ¹⁶⁷, visualizados em transiluminador ultravioleta e a imagem registrada com câmera digital.

4.6 SUBTIPAGEM MOLECULAR POR AMPLIFICAÇÃO DE MÚLTIPLOS LOCI DE FAGOS (MAPLT)

A técnica de MAPLT (*Multiple Amplification of Phage Loci Typing*), baseada na reação em cadeia da polimerase, foi utilizada para subtipagem das estirpes de *Salmonella*. Foi utilizado um conjunto de sete pares de *primers* que tem como alvo *loci* de 3 fagos encontrados comumente no genoma de *Salmonella* (ST64B, ST64T e P22) os quais apresentaram resultados variados para estirpes de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium ^{158; 159; 160; 168}. Os *loci* testados foram SB46_{ST64B}, SB28_{ST64B}, *gtrA*_{p22}, *gtrB*_{p22}, *C1*_{ST64B}, SB21_{ST64B} e SB26_{ST64B}. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen e as sequências e o tamanho dos amplicons então indicados na TABELA 2.

As reações foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®) e os volumes e as concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR para tipagem por MAPLT são os mesmos descritos acima no item 4.4. Os primers SB46_{ST64B} e SB28_{ST64B} foram testados em PCR duplex utilizando o seguinte programa: 1 ciclo a 95°C (2 minutos), 30 ciclos a 95°C (30 segundos), 58°C (1 minuto), 72°C (2 minutos) e um ciclo final a 72°C (5 minutos). Os primers *gtrB*_{p22}, *c1*_{ST64B}, SB21_{ST64B} e SB26_{ST64B} foram testados individualmente utilizando as mesmas condições; para *gtrA*_{p22} a única diferença foi a temperatura de anelamento de 61°C (1 minuto). A detecção dos produtos PCR foi realizada de acordo com o item 4.5.

TABELA 2 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS AMPLICONS NA TIPAGEM DE *Salmonella* POR MAPLT

Primer	Locus	Sequência (5' → 3')	Tamanho do Fragmento (pb)	Referência
<i>c1</i> _{ST64B}	<i>c1</i> _{ST64B}	F-TGTGTCGTTTGAGTGA CTGCG R-TTCTAGGCTGGCTGA CTGC	548	160
SB21 _{ST64B}	SB21 _{ST64B}	F-CTGTAT GGTTATATCGATTATCTGG R-GATTTCTTTGCC CAGA TGACG	478	160; 168
SB26 _{ST64B}	SB26 _{ST64B}	F-GACA CCATCAATGTATGGATCGC R-AGGTTATCTATAATTCCGACCTGG	477	159
SB28 _{ST64B}	SB28 _{ST64B}	F-TGCAGTCAAGAGGACGTCC R-TGCCGATATGCTGATCTGGC	589	159
SB46 _{ST64B}	SB46 _{ST64B}	F-CATTGATGGTATCGAAGTTCCGCC R-ATCTTATCGGCAGCCATACC	401	160
<i>gtrA</i> _{p22}	<i>gtrA</i> _{p22}	F-AGACCTTTCCGAATCCGCTG R-TAATTGCCGAGAAAGTGATAAGGG	336	160
<i>gtrB</i> _{p22}	<i>gtrB</i> _{p22}	F-CTTTCT CGGCAATTAGCCTG R-TTAGCCAGCACCATATCCGC	423	160

FONTE: O autor (2016).

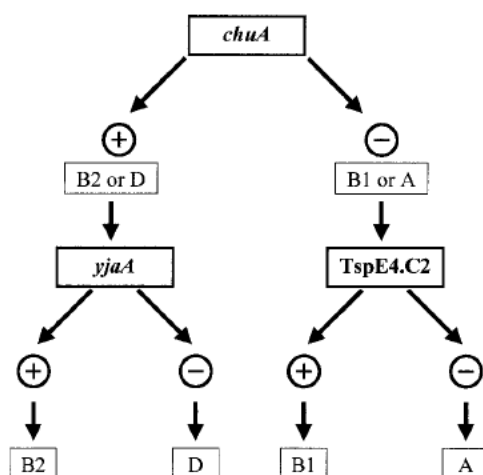
Foram realizados no mínimo dois experimentos independentes para cada estirpe.

4.7 DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE *E. coli* DIARREOGÊNICAS

A determinação do grupo filogenético das DEC foi realizada utilizando o protocolo de PCR triplex desenvolvido por Clermont, Bonacorsi e Bingen et al ⁴⁵. Os volumes e as concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR são os mesmos descritos acima no item 4.4 com exceção dos primers que foram utilizados nas concentrações de 8 pmol para o *chuA*, 12 pmol para *YjaA* e 10 pmol para *TspE4C2*. Os *primers* foram sintetizados pela Bioneer (Daejeon, KR) e suas

sequências e tamanhos dos amplicons estão indicados na TABELA 3. Segundo Clermont, Bonacorsi e Bingen ⁴⁵ com os resultados dessas reações é possível determinar os quatro grupos filogenéticos principais de *E. coli* denominados A, B1, B2 e D de acordo com a FIGURA 3.

FIGURA 3 – ÁRVORE PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE *Escherichia coli*



FONTE: CLERMONT, BONACORSI E BINGEN ⁴⁵.

NOTA: Esquema utilizado para determinação do grupo filogenético de estirpes de *E.coli* segundo CLERMONT, BONACORSI E BINGEN ⁴⁵.

A reação de PCR foi realizada em termociclador Veriti utilizando os ciclos de amplificação descritos na TABELA 3. A detecção dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose como descrito no item 4.5.

TABELA 3 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS, CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO E TAMANHO DOS AMPLICONS DA PCR PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE DEC

Primer	Gene	Sequência (5'→ 3')	Ciclo de Amplificação (30X)*	Tamanho do Fragmento (bp)
ChuA	<i>ChuA</i>	F-GACGAACCAACGGTCAGGAT R-TGCCGCCAGTACCAAAGACA	30s a 94°C, 30s a 55°C e 30s a 72°C	279
YjaA	<i>YjaA</i>	F-TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG R-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	30s a 94°C, 30s a 55°C e 30s a 72°C	211
TspE4.C2	<i>TspE4.C2</i>	F- GAGTAATGTCTGGGGCATTC R-CGCGCCAACAAAGTATTACG	30s a 94°C, 30s a 55°C e 30s a 72°C	152

FONTE: Adaptada de CLERMONT, BONACORSI E BINGEN ⁴⁵.

LEGENDA: *Antes de iniciar os 30 ciclos de amplificação foi realizado um ciclo de 5 min a 94°C e após os 30 ciclos um ciclo de 7 min a 72°C.

Foram realizados no mínimo dois experimentos independentes para cada estirpe.

4.8 DETECÇÃO DE GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM *E. coli* DIARREOGÊNICAS

Foi investigada a presença de 10 genes de virulência nas estirpes de *E. coli* diarreogênicas através da reação em cadeia da polimerase. Os genes de virulência pesquisados, as sequências dos *primers* utilizados e tamanho dos amplicons estão indicados na TABELA 4. Os primers foram sintetizados pela empresa Bioneer exceto o primer *ehxA* que foi sintetizado pela Invitrogen.

TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS*, PROPRIEDADES E TAMANHO DOS AMPLICONS PARA A DETECÇÃO DOS GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA DE *E.coli* DIARREOGÊNICAS.

Primer	Gene	Propriedade	Patotipos*	Sequência (5'→ 3')	Tamanho do Fragmento (pb)	Referência
nleE	<i>nleE</i>	Proteína efetora E não codificada por LEE	EPEC, EHEC	F-CTAATACTCAGGGCGTGTCC R-ACCGTCTGGCTTTCTCGTTA	192	169
nleB	<i>nleB</i>	Proteína efetora B não codificada por LEE	EPEC, EHEC	F-GGTGTGCTGGTAGATGGA R-CAGGGTATGATTCTTGTATG	175	169
pic	<i>pic</i>	Mucinase envolvida na colonization (Pic)	EAEC	F-AGCCGTTTCCGCAGAAGCC R-AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG	1.111	170
astA	<i>astA</i>	Enterotoxina termoestável I EAEC (EAST1)	EAEC	F-TGCCATCAACACAGTATATCCG R-ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT	102	170
efa1/lifA	<i>efa1/lifA</i>	Fator de aderência de EHEC (Efa1) idêntico a lifA (linfostatina)	EPEC, EHEC	F-TATCAGGCCAATCAAAACAG R-AGACACTGGTAAATTTTCGC	974	171
aggR	<i>aggR</i>	Fator ativador transcricional de AAF/I e AAF/II	EAEC	F-GTATACACAAAAGAAGGAAGC R-ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	172
lha	<i>lha</i>	adesina lha (homóloga à adesina IrgA)	STEC	F-CAGTTCAGTTTCGCATTACCC R-GTATGGCTCTGATGCGATG	1305	173
katP	<i>katP</i>	Catalase/peroxidase (codificada pelo plasmídeo pO157)	STEC	F-CTTCCTGTTCTGATTCTTCTGG R-AACTTATTTCTCGCATCATCC	2125	98
subAB	<i>subAB</i>	Citotoxina subtilase	STEC	F-TATGGCTTCCCTCATTGCC R-TATAGCTGTTGCTTCTGACG	556	171
ehxA	<i>ehxA</i>	Enterohemolisina	STEC	F-GCATCATCAAGCGTACGTTCC R-AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	87

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: *Patotipos de DEC nos quais os genes foram primeiramente detectados.

Os volumes e as concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR são os mesmos descritos acima no item 4.4. A reação de PCR foi realizada em termociclador Veriti utilizando os ciclos de amplificação descritos nas TABELAS 5 a 9. A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose como descrito no item 4.5.

As condições utilizadas na amplificação do gene *nleE* estão descritas na tabela abaixo.

TABELA 5 – PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR PARA *nleE*

Etapas	Temperatura	Duração	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	5min	1
Desnaturação	94°C	30s	30
Anelamento	61°C	20s	30
Extensão	72°C	40s	30
Extensão	72°C	7min	1

FONTE: O autor (2016).

Para os genes *nleB* e *subAB* as condições foram as mesmas diferindo apenas na temperatura de anelamento que foi de 56°C para ambos.

Na TABELA 6 estão descritas as condições utilizadas para a amplificação do gene *efa1/lifA*.

TABELA 6 – PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR PARA O GENE *efa1/lifA*

Etapas	Temperatura	Duração	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	5min	1
Desnaturação	94°C	30s	30
Anelamento	58°C	30s	30
Extensão	72°C	1:30min	30
Extensão	72°C	7min	1

FONTE: O autor (2016).

Para os genes *iha* e *ehxA* as condições foram as mesmas diferindo apenas na temperatura de anelamento que foi de 56°C e 65°C respectivamente.

O programa utilizado para a amplificação do gene *astA* está descrito na TABELA 7.

TABELA 7 – PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR PARA O GENE *astA*

Etapa	Temperatura	Duração	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	5min	1
Desnaturação	94°C	30s	30
Anelamento	63°C	20s	30
Extensão	72°C	30s	30
Extensão	72°C	7min	1

FONTE: O autor (2016).

Para o gene *aggR* as condições foram as mesmas diferindo apenas na temperatura de anelamento que foi de 59°C.

Para a amplificação dos genes *pic* e *katP* foram utilizados os programas descritos nas TABELAS 8 e 9 respectivamente.

TABELA 8 – PROGRAMA UTILIZADO NA PCR PARA O GENE *pic*

Etapa	Temperatura	Duração	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	5min	1
Desnaturação	94°C	30s	30
Anelamento	58°C	30s	30
Extensão	72°C	1:40min	30
Extensão	72°C	7min	1

FONTE: O autor (2016).

TABELA 9 – PROGRAMA UTILIZADO NA REAÇÃO DE PCR GENE *katP*

Etapa	Temperatura	Duração	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	5min	1
Desnaturação	94°C	40s	30
Anelamento	57°C	20s	30
Extensão	72°C	2:10min	30
Extensão	72°C	7min	1

FONTE: O autor (2016).

Foram realizados no mínimo dois experimentos independentes para cada estirpe.

Os produtos das reações de PCR foram detectados como descrito no item 4.5.

4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

A suscetibilidade aos antimicrobianos para 11 isolados de *Salmonella* e 21 *E.coli* diarreogênicas foi determinada pelo método de disco-difusão, utilizando os

discos de antimicrobianos e o meio Mueller-Hinton ágar produzidos pela Oxoid, de acordo com o documento M100-S21 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) ¹⁷⁴. Para as demais estirpes o perfil de resistência foi determinado anteriormente ^{175; 24} utilizando disco-difusão.

Para os isolados de *Salmonella* foram testados ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), sulfametaxazol/trimetoprim (23,75/1,25 µg), ceftazidima (30 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), aztreonam (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefoxitina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e levofloxacina (5 µg).

Para as estirpes de DEC foram testados ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), sulfametaxazol/trimetoprim (23,75/1,25 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), ceftazidima (30 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), aztreonam (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefepime (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg) e ciprofloxacina (5 µg).

4.10 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

A eletroforese em campo pulsado foi realizada para a subtipagem de *Salmonella* e DEC visando definir o número de clones de cada patógeno identificados no estado do Paraná e a respectiva relação com surtos e/ou casos esporádicos de diarreia.

A técnica foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo Pulse Net Internacional ^{157; 176} para estirpes de *Salmonella* spp e *E.coli* diarreogênicas e foram realizados no mínimo dois experimentos independentes de PFGE para cada estirpe. A PFGE envolve várias etapas incluindo o cultivo bacteriano e ajuste da densidade ótica da cultura, preparo dos *plugs*, lise celular, digestão do DNA imobilizado e por fim a eletroforese em campo pulsado descritos resumidamente a seguir.

Após o cultivo bacteriano, realizado em TSA como descrito no item 4.2, a etapa seguinte é a confecção dos *plugs* de agarose contendo a suspensão bacteriana.

4.10.1 Preparo dos *plugs*

Os *plugs* foram preparados com a agarose SeaKem Gold a 1% em tampão TE (Tris 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]). Após a fusão da agarose, o gel foi mantido em banho-maria em temperatura entre 55°C a 60°C até o momento da utilização.

As suspensões de células foram preparadas com colônias bacterianas removidas da placa de ágar com alça bacteriológica estéril e transferidas para tubos Falcon de 50 ml contendo 2 ml de tampão de suspensão celular (CSB) (Tris 100 mM [pH 8,0], EDTA 100 mM [pH 8,0]). A concentração de cada suspensão celular foi ajustada para uma densidade óptica de 0,8 - 1,0, medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 610 nm.

Uma alíquota de 400 µl de cada suspensão de células foi transferida para um tubo estéril tipo Eppendorf de 1,5 ml contendo 20 µl de proteinase K (20 mg/ml) e homogeneizada suavemente com a pipeta. Na sequência 400 µl do gel de agarose foi adicionado a cada suspensão celular, homogeneizado suavemente e então a mistura foi transferida para os poços do molde. Após a solidificação dos blocos de agarose contendo as suspensões bacterianas (*plugs*), estes foram removidos dos moldes e armazenados em tubo do tipo Eppendorf de 1,5 ml contendo 1,3 ml de tampão para lise celular (CLB; Tris 50 mM [pH 8,0], EDTA 50 mM [pH 8,0], Sarcosil 1%) e mantidos a 4°C até o momento do uso.

4.10.2 Lise celular nos *plugs* de agarose

Foram transferidos 5 ml de tampão de lise celular e 25 µl de proteinase K (20 mg/ml) para tubos Falcon de 50 ml. Na sequência, cada *plug* solidificado foi transferido para um tubo Falcon contendo a mistura preparada anteriormente e incubado em banho-maria a 54-55°C por 3 horas. Nesta etapa o detergente sarcosil, presente no tampão de lise celular lisa as membranas celulares auxiliando na liberação do DNA.

4.10.3 Lavagem dos *plugs*

Após as 3h os *plugs* foram removidos do banho-maria e o tampão de lise descartado. Então foi feita a adição de 15 ml de água estéril pré-aquecida a 54-55°C no tubo Falcon contendo o *plug* e este foi incubado a 54-55°C por 13 minutos. Após esse período a água foi removida e foi repetido o mesmo procedimento mais duas vezes e então, após desprezar a água, foram adicionados 15 ml de tampão TE estéril pré-aquecido a 54-55°C ao tubo que foi então incubado por 13 min a 54-55°C e este procedimento foi repetido mais duas vezes completando 6 ciclos de lavagem no total.

4.10.4 Digestão do DNA imobilizado

A digestão do DNA imobilizado das estirpes de *Salmonella* spp e *E. coli* diarreogênicas foi realizada utilizando a endonuclease de restrição *Xba*I (Fermentas Life Sciences; Vilnius, LT) como enzima primária. *Avr*II (Thermo Scientific; Waltham, USA) foi utilizada como enzima secundária somente com *Salmonella* nos casos em que os padrões de PFGE obtidos com a enzima primária foram indistinguíveis.

Os *plugs* foram fracionados em três partes de aproximadamente 2 mm de espessura e transferidos para um tubo contendo 200 µl incluindo 20 µl do tampão Tango 10X, água ultrapura estéril 177 µl e 3 µl da enzima (30U da enzima de restrição). Os tubos contendo as fatias de *plugs* foram incubados em gelo por uma hora e então levados à estufa a 37°C por 16 horas.

Após a incubação as tiras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos e então colocadas nos poços de um gel de agarose SeaKem Gold a 1% preparada em TBE 0,5X.

4.10.5 Condições de eletroforese

As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando o sistema CHEF-DR® III (Bio-Rad, Hercules CA, USA). Para as estirpes de *Salmonella* as condições foram: 6 V/cm por 18:30 horas a 14°C com tempo de pulso variando entre 2,2 a 63,8 segundos.

Para as estirpes de *E.coli* diarreogênicas as condições foram as mesmas exceto pelo tempo de pulso variando entre 6,8 a 35,3 segundos.

Salmonella sorotipo Braenderup (ATCC® BAA-664™) foi utilizada como marcador para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA. A bactéria foi preparada como descrito acima.

Após a corrida eletroforética os géis foram colocados em solução de brometo de etídio e os fragmentos de DNA visualizados em transiluminador UV como descrito no item 4.5.

4.10.6 Análise dos géis

As imagens dos géis foram analisadas com o software BioNumerics 7.5 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium) e os padrões de bandas foram comparados utilizando a análise de *cluster* com o coeficiente de similaridade Dice e UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) para gerar dendrograma com 1,5% de otimização e 1,5% de tolerância de bandas. Somente os fragmentos de DNA entre 20,5 a 1135 kb foram incluídos nos perfis de PFGE. A diferenciação entre os perfis foi julgada de acordo com os critérios descrito por Barrett, Gerner-Smidt e Swaminathan ¹⁵⁴, sendo os perfis considerados como distintos quando qualquer diferença no número e posição de bandas foi observado.

4.10.7 Índice discriminatório

A capacidade discriminatória (D) da PFGE foi calculada de acordo com Hunter e Gaston ¹⁷⁷ utilizando a fórmula abaixo:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Onde:

D = Capacidade ou índice discriminatório

N = número total de estirpes na população amostral

S = número total de perfis descritos

n_j = número de estirpes pertencentes a cada perfil

O poder discriminatório de um método de tipagem é a sua capacidade para distinguir entre as linhagens não relacionadas com base na probabilidade de duas estirpes independentes serem caracterizadas como o mesmo clone. Este índice discriminatório pode ser usado para comparar métodos de tipagem e selecionar o que apresenta melhor discriminação ¹⁷⁷.

5 RESULTADOS

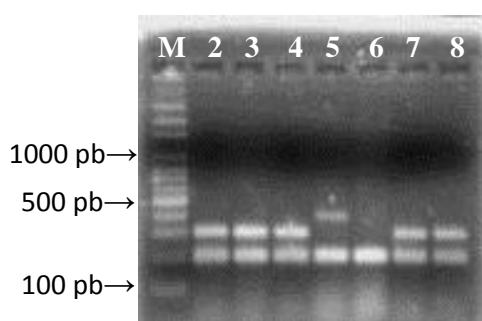
5.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Salmonella*

A FIGURA 4 sintetiza os resultados obtidos nas reações de PCR para identificação de bactérias do gênero *Salmonella* e dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium. Como esperado, as estirpes previamente identificadas através do perfil bioquímico, bem como os controles positivos, tiveram sua identificação como *Salmonella* confirmada através de PCR.

Em relação a PCR para a sorotipagem molecular, entre as estirpes de *Salmonella* utilizadas como controles, resultados positivos foram observados somente para as estirpes que pertencem aos sorotipos Enteritidis e Typhimurium confirmando assim a especificidade dos *primers*. Para *E. coli* não foi observada amplificação com nenhum dos *primers* utilizados.

Entre as 46 estirpes isoladas de pacientes 33 (71,7%) foram caracterizadas a nível molecular como pertencentes ao sorotipo Enteritidis, incluindo aquelas previamente identificadas utilizando antisoro ²⁴. As 13 (28,3%) estirpes restantes foram identificadas como pertencentes ao sorotipo Typhimurium.

FIGURA 4 – PERFIS REPRESENTATIVOS DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA OBTIDA POR PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* E OS SOROTIPOS Enteritidis E Typhimurium



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Gel de agarose a 2,0% dos produtos de PCR. Linha M, marcador de massa molecular 100 pb (Axygen). Linhas 2-4, resultados obtidos para as estirpes 134FA, 135FA e 136FA respectivamente representando *Salmonella* Enteritidis; Linha 5 estirpe 68FA, *Salmonella* Typhimurium; Linha 6 *Salmonella* Livingston; Linhas 7 e 8 estirpes 137FA e 62FA, *Salmonella* Enteritidis. O fragmento de 204pb representa o amplicon referente à OMPC que identifica o gênero *Salmonella*; o fragmento de 304pb (ENT) identifica o sorotipo Enteritidis e o fragmento de 401pb (TYPH) caracteriza o sorotipo Typhimurium.

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella*

De acordo com o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos as estirpes de *Salmonella* foram classificadas em 7 grupos designados R0 a R6 como descrito na TABELA 10. O perfil de resistência de cada estirpe isoladamente está mostrado na FIGURA 5.

Entre as 46 estirpes de *Salmonella* analisadas apenas quatro, (07FA, 23FA, 37FA e 51FA) todas pertencentes ao sorotipo Typhimurium, foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Trinta e nove estirpes (84,8%) foram resistentes ao ácido nalidíxico estando entre elas todas as estirpes do sorotipo Enteritidis (33). Três estirpes de *Salmonella* Typhimurium (154FA, 191FA, 60FA) apresentaram resistência a 3 ou mais antimicrobianos de classes distintas (multirresistência) incluindo ácido nalidíxico, ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol.

TABELA 10 – PADRÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE *Salmonella*

Antimicrobiano(s)	Sorotipo/(Número de estirpes)	Perfil de Resistência
Nenhum	S.Typhimurium (4)	R0
Ácido Nalidíxico	S.Enteritidis (33), S.Typhimurium (3)	R1
Tetraciclina	S.Typhimurium (2)	R2
Ácido Nalidíxico, Ampicilina, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Tetraciclina, Cloranfenicol	S.Typhimurium (1)	R3
Ácido Nalidíxico, Ampicilina, Tetraciclina, Cloranfenicol	S.Typhimurium (1)	R4
Ácido Nalidíxico, Sulfametoxazol/Trimetoprim	S.Typhimurium (1)	R5
Ampicilina, Tetraciclina, Cloranfenicol	S.Typhimurium (1)	R6

FONTE: O autor (2016).

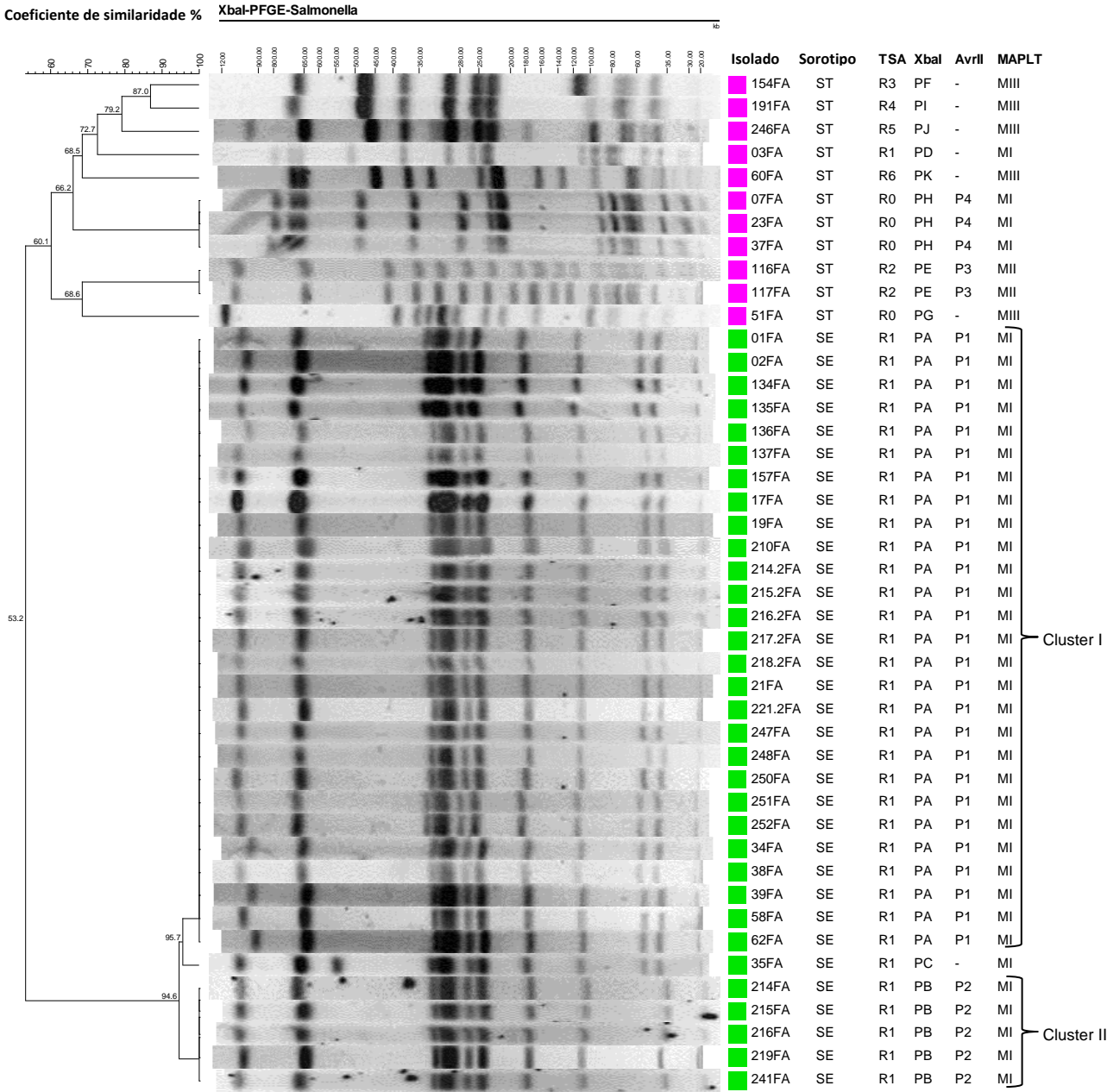
5.3 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DE *Salmonella* POR PFGE

Onze perfis de PFGE distintos com a enzima *Xba*I, que foram designados sequencialmente de PA a PK, contendo de 10 a 19 fragmentos, foram identificados entre os isolados (FIGURA 5). O índice discriminatório da PFGE para o sorotipo *Salmonella* Enteritidis foi de 0,32. Três perfis relacionados (PA, PB, PC) foram distinguidos entre as estirpes pertencentes ao sorotipo Enteritidis. PA foi o perfil predominante compartilhado por 27 (81,8%) estirpes de *Salmonella* Enteritidis. O perfil B diferencia-se do PA pela ausência de um fragmento de aproximadamente 54 kb e foi detectado em 5 (15,2%) estirpes. O perfil C diferencia-se do PA pela presença de uma banda de aproximadamente 550 kb e foi observado em somente 1 estirpe (3,0%) conforme mostrado na FIGURA 5.

A enzima secundária *Avr*II, que foi utilizada apenas para separar as estirpes que apresentaram o mesmo perfil de PFGE, ou seja aquelas pertencentes aos grupos PA e PB, diferenciou as estirpes de *Salmonella* Enteritidis em 2 grupos designados P1 e P2 (FIGURA 6). As estirpes foram então classificadas como PA/P1, PB/P2 e PC/- que contém apenas uma estirpe.

Entre as 13 estirpes de *Salmonella* Typhimurium duas foram não tipáveis. Oito perfis de PFGE (PD a PK) foram encontrados entre as 11 estirpes restantes. Os perfis H e E contem respectivamente 3 e 2 estirpes. As outras estirpes apresentaram perfis únicos de PFGE (FIGURA 5). O índice discriminatório da PFGE para o sorotipo *Salmonella* Typhimurium foi de 0,93. A utilização da *Avr*II indicou que todas as estirpes de PE pertencem ao perfil P3 (PE/P3) e estirpes PH ao perfil P4 (PH/P4).

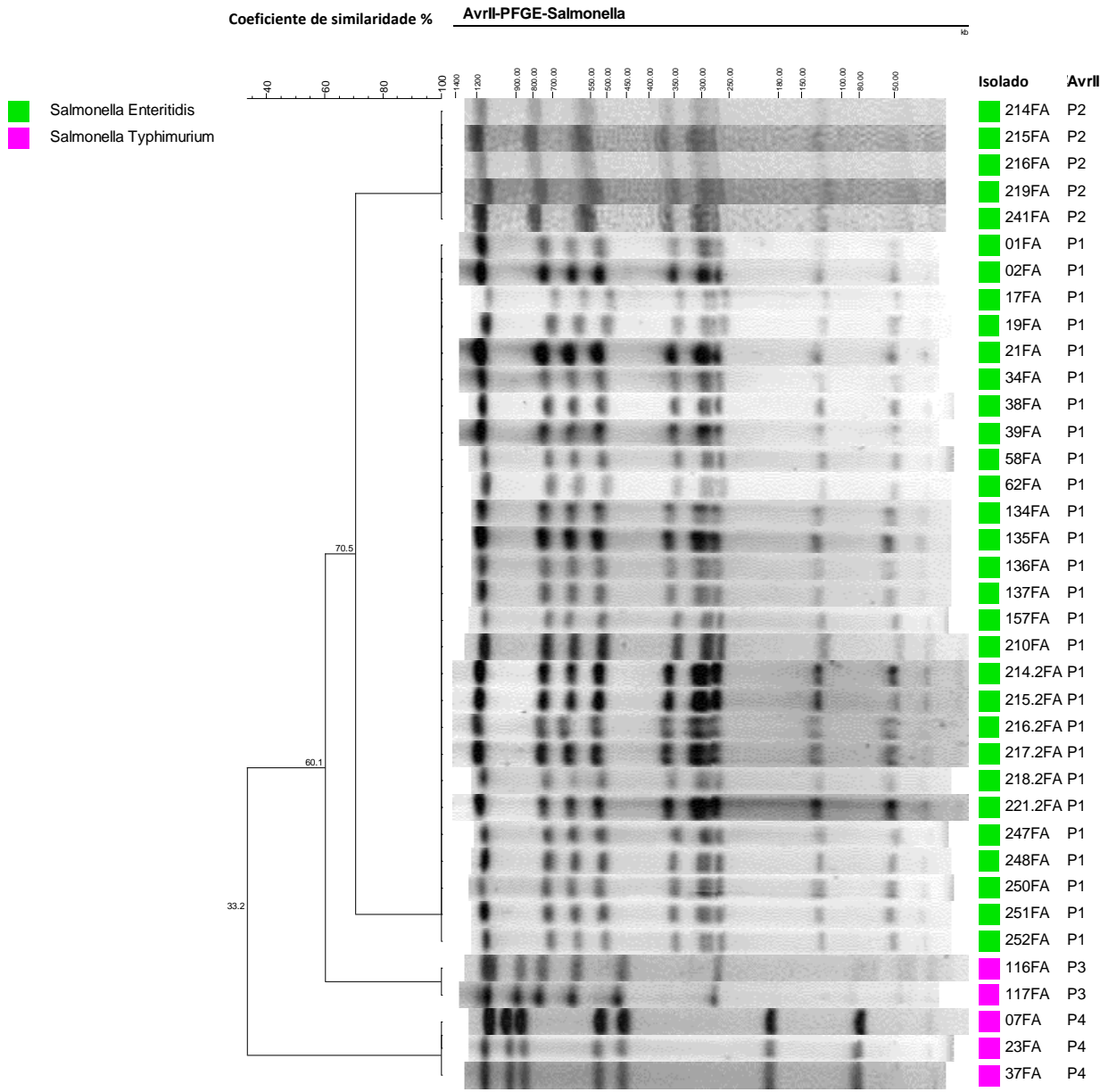
FIGURA 5 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella* Typhimurium UTILIZANDO A ENZIMA *Xba*I NA PFGE



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Dendrograma representando relação genética entre 44 isolados de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Os números representam a similaridade genética entre as estirpes. A coluna “isolado” indica os isolados de *Salmonella*; “sorotipo” indica os sorotipos encontrados, S.Enteritidis – SE e S.Typhimurium – ST. A coluna “TSA” indica os perfis de resistência aos antimicrobianos (R0 a R6); a coluna *Xba*I designa os perfis de PFGE obtidos com a enzima *Xba*I (PA a PK) e a coluna “*Avr*II” indica os padrões de PFGE com a enzima *Avr*II (P1 a P4). (-) representa os isolados não analisados com *Avr*II. A coluna “MAPLT” informa os perfis de MAPLT (MI a MIII). Duas estirpes foram não tipáveis.

FIGURA 6 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella* Typhimurium UTILIZANDO A ENZIMA *AvrII* NA PFGE



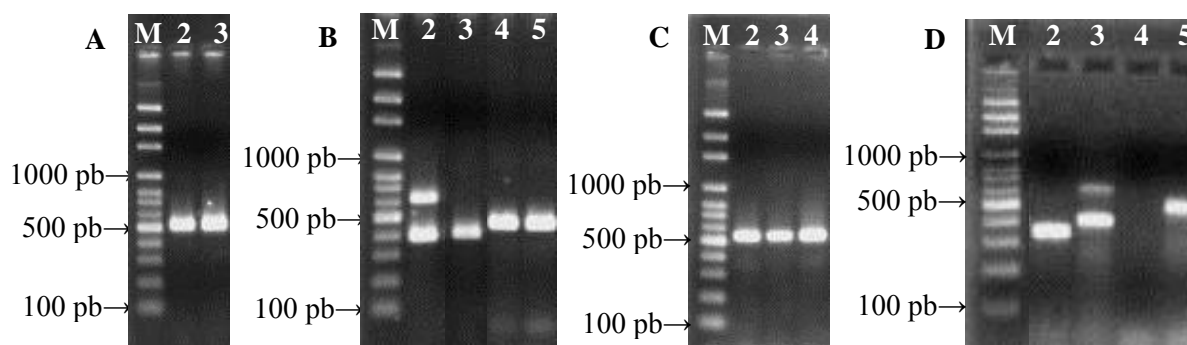
FONTE: O autor (2016).
LEGENDA: Perfis de PFGE obtidos utilizando a enzima *AvrII* para a digestão do DNA genômico. A primeira coluna “Isolado” informa os isolados e a segunda coluna “AvrII” os diferentes perfis obtidos (P1 a P4).

Todas as estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram resistentes ao ácido nalidíxico (perfil R1), portanto não foi possível fazer uma associação com os perfis da PFGE. Com relação às estirpes de *Salmonella* Typhimurium houve diversos perfis de resistência aos antimicrobianos, sendo que o perfil R2 (resistente à tetraciclina) foi associado ao perfil PE de PFGE.

5.4 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DE *Salmonella* por MAPLT

Os produtos de amplificação para cada *loci* e que determinam os perfis de MAPLT estão representados na FIGURA 7.

FIGURA 7 – GÉIS REPRESENTATIVOS DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE *LOCi* NA SUBTIPAGEM POR MAPLT



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Gel de agarose a 2,0% contendo produtos de PCR para os 7 *loci* de profagos selecionados para a subtipagem por MAPLT. Linha M (figuras A-D) marcador de massa molecular 100 pb (Axygen). **A)** linhas 2-3 amplicon para o *locus* SB26_{ST64B} (477 pb). **B)** linha 2 amplicons para SB46_{ST64B} (401 pb) e SB28_{ST64B} (589 pb); linha 3 amplicon de SB46_{ST64B} (401 pb); linhas 4-5 amplicons do *loci* SB21_{ST64B} (478 pb). **C)** linhas 2-4 representam amplicons para *c1*_{ST64B} (548 pb). **D)** linha 2 amplicon para *gtrA*_{p22} (336 pb); linha 3 amplicons para SB46_{ST64B} e SB28_{ST64B}; linha 4 branco da reação; linha 5 produto de que amplificação para *gtrB*_{p22} (423 pb).

Os resultados de MAPLT permitiram classificar as estirpes em 3 subtipos designados de MI a MIII, de acordo com o número e tipo de *loci* identificados nas bactérias, como descrito a seguir:

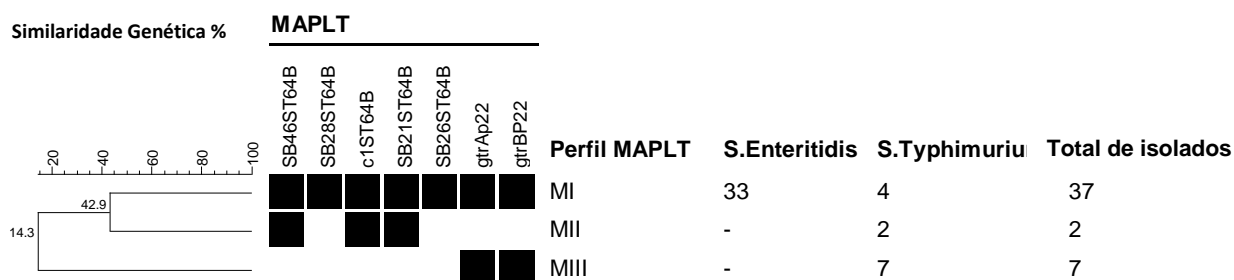
MI: SB46_{ST64B}⁺, SB28_{ST64B}⁺, *gtrA*_{p22}⁺, *gtrB*_{p22}⁺, *C1*_{ST64B}⁺, SB21_{ST64B}⁺, SB26_{ST64B}⁺;

MII: SB46_{ST64B}⁺, *C1*_{ST64B}⁺, SB21_{ST64B}⁺

MIII: *gtrA*_{p22}⁺, *gtrB*_{p22}⁺

Os subtipos ao qual pertence cada estirpe estão indicados na FIGURA 5. A FIGURA 8 representa a distribuição de cada perfil de MAPLT entre os sorotipos e a relação genética entre as mesmas.

FIGURA 8 – RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE *Salmonella* COMO DETERMINADO POR MAPLT



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Relação genética entre os 46 isolados de *Salmonella* baseada no perfil de MAPLT. Os blocos pretos representam amplificação na PCR para cada *locus*. Os perfis resultantes estão indicados na coluna Perfil MAPLT. O número de isolados de cada sorotipo e a respectiva classificação por MAPLT estão indicados nas colunas “S. Enteritidis” e “S.Typhimurium”. A coluna “Total de isolados” indica o número total de estirpes de acordo com os perfis de MAPLT.

Todas as estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram classificadas no perfil MI de MAPLT. Portanto o genótipo resultante da subtipagem pelos 2 métodos (PFGE e MAPLT) resultou nos grupos PA/P1/MI, PB/P2/MI e PC/-/MI, representando respectivamente cortes com *Xba*I, *Avr*II e resultado do MAPLT. Todas as 13 estirpes de *Salmonella* Typhimurium foram tipáveis por MAPLT, sendo classificadas nos perfis MI, MII e MIII. O genótipo resultante da subtipagem por PFGE e MAPLT resultou nos grupos PF/-/MIII, PI/-/MIII, PJ/-/MIII, PD/-/MI, PK/-/MIII, PH/P4/MI, PE/P3/MII e PG/-/MIII (FIGURA 8). Para as estirpes 68FA e 59FA foi possível somente subtipagem por MAPLT e ambas pertencem aos grupos MIII.

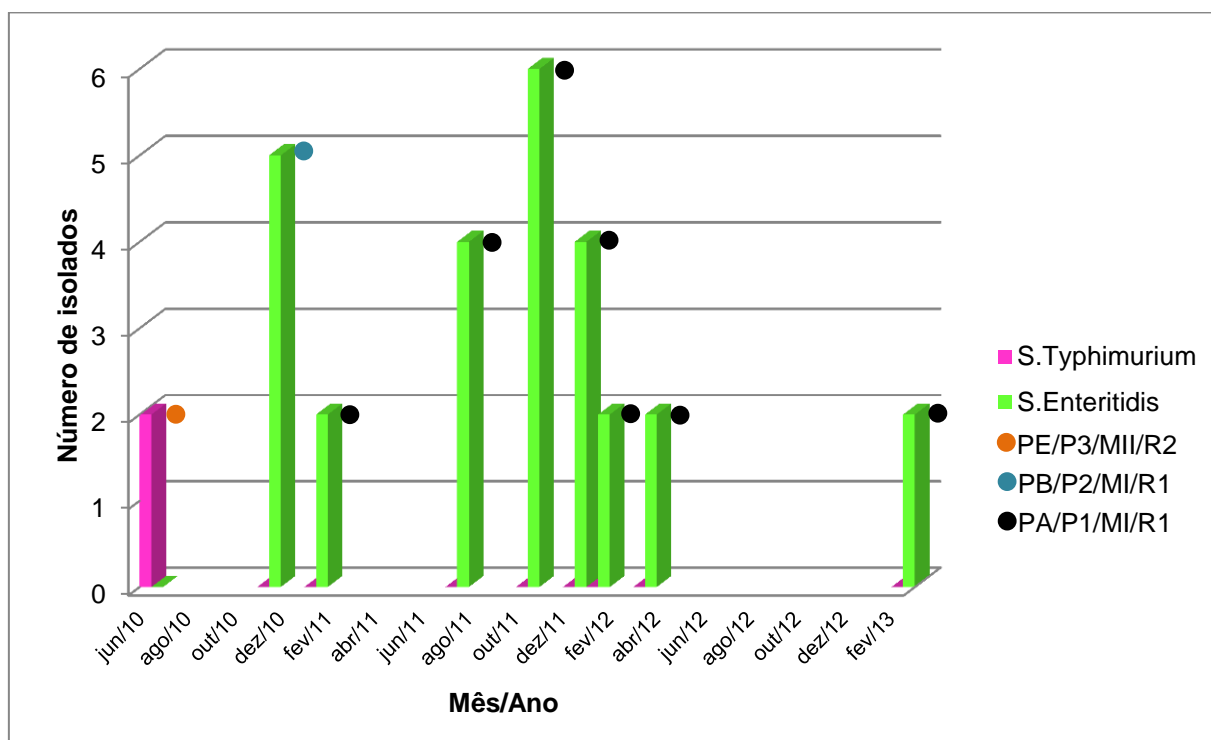
Como indicado na FIGURA 5, dois *clusters* de *Salmonella* Enteritidis foram encontrados. Um contém as 27 estirpes que apresentam o perfil PA/P1/MI/R1. Entre esses, seis foram isolados de pacientes com diarreia esporádica e 20 de pacientes envolvidos em 6 surtos alimentares ocorridos entre julho de 2011 e fevereiro de 2013 (GRÁFICO 1) (respectivamente, estirpes 134-137FA; 214.2-218.2 e 221.2FA; 248, 250-252FA; 01-02FA; 38-39FA; 17 e 21FA). Interessantemente, a outra estirpe com perfil PA/P1/MI/R1 foi isolada de um surto alimentar ocorrido em janeiro de 2011 representado pelas estirpes 34FA e 35FA as quais exibiram respectivamente, perfis PA/P1/MI/R1 e PC/-/MI/R1 (FIGURA 5; FIGURA 6). Os perfis de PFGE são relacionados, ou seja, apresentam o mesmo perfil de bandas diferindo por somente um fragmento de DNA, mas o MAPLT não foi capaz de distinguir essas estirpes.

O segundo cluster de *Salmonella* Enteritidis contém as estirpes 214-216FA, 219FA e 241FA que apresentam perfil PB/P2/MI/R1. Estas foram isoladas de

pacientes envolvidos em um surto alimentar ocorrido em novembro de 2010 (GRÁFICO 1).

Somente um surto alimentar, ocorrido em junho de 2010 (GRÁFICO 1), foi associado ao sorotipo Typhimurium e inclui as estirpes 116-117FA com perfil PE/P3/MII/R2 (FIGURA 5; FIGURA 6). As demais estirpes de *Salmonella* Typhimurium foram isoladas de casos esporádicos de diarreia.

GRÁFICO 1- DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DOS 9 SURTOS DE DIARREIA CAUSADOS POR *Salmonella*, NOTIFICADOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2010 E 2013



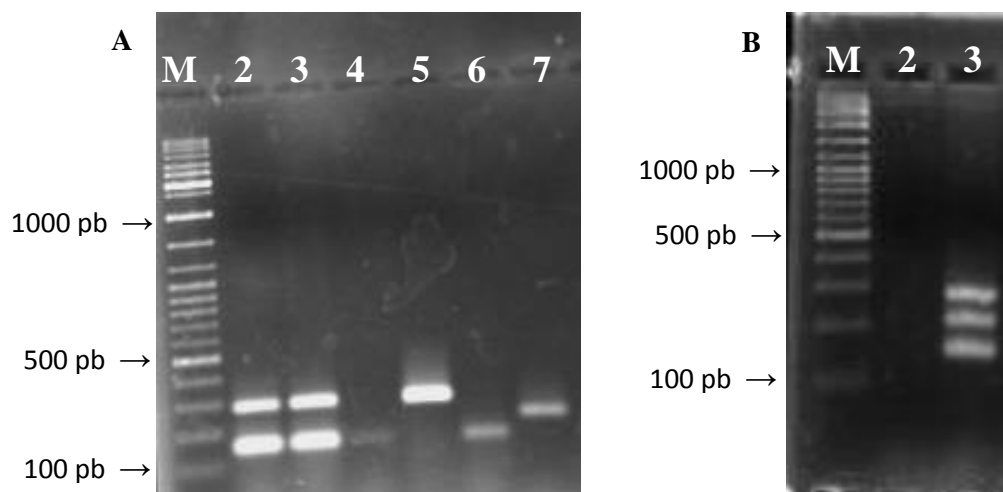
FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: PE) Perfil E de PFGE com a enzima *Xba*I. P3) Perfil 3 de PFGE com a enzima *Ar*VI. MII) Perfil MII de MAPLT. R2) Perfil R2 de resistência aos antimicrobianos. PB) Perfil B de PFGE *Xba*I, P2) Perfil 2 de PFGE *Ar*VI. MI) Perfil MI de MAPTL. R1) Perfil R1 de resistência aos antimicrobianos. PA) Perfil A de PFGE *Xba*I. P1) Perfil 1 de PFGE *Ar*VI.

5.5 DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE DEC

A determinação do grupo filogenético das DEC foi realizada através de PCR triplex utilizando o método desenvolvido por Clermont, Bonacorsi e Bingen ⁴⁵.

FIGURA 9 – PERFIS REPRESENTATIVOS DA PCR TRIPLEX PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO OBSERVADOS PARA DEC



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Gel de agarose a 2,0% com produtos de PCR triplex. **A.** Linha M. Marcador de massa molecular 100 pb (Axygen). Linhas 2-3. Estirpes do grupo filogenético D (amplicons de 279 pb para *chuA* e 152 pb para *TspE4.C2*). Linhas 4 e 6 estirpes do grupo B1 (amplicon de 152pb - *TspE4.C2*). Linha 5. Estirpe do grupo D (amplicon de 279 pb - *chuA*). Linha 7. Estirpe do grupo A (amplicon de 211 pb - *yjaA*). **B)** Linhas M. Marcador de massa molecular 100 pb (Axygen). Linha 2. Branco da amostra. Linha 3. Estirpe do grupo B2 (amplicons para *chuA* -279 pb, *yjaA* -211 pb e *TspE4.C2* - 152 pb).

A classificação das estirpes entre os 4 grupos filogenéticos estão mostrados na TABELA 11. Entre as 66 estirpes estudadas 19 (28,8%) foram classificadas como grupo A, 10 (15,2%) como grupo B1, 23 (34,8%) como grupo B2 e 14 (21,2%) como grupo D. A maioria das estirpes de DEC analisadas pertence aos grupos A e B2 totalizando 63,6%.

TABELA 11 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS POR PATOTIPO DAS ESTIRPES DE *Escherichia coli* DIARREOGÊNICAS

Patotipo (N)	Grupo filogenético			
	A	B1	B2	D
aEPEC (38)	13	6	11	8
tEPEC (1)	-	-	1	-
STEC (4)	-	-	-	4
EAEC (19)	5	4	8	2
DAEC (3)	-	-	3	-
EIEC (1)	1	-	-	-
Total	19	10	23	14

FONTE: O autor (2016).

Entre os dois patotipos com maior número de isolados, aEPEC (38) e EAEC (19), as estirpes foram distribuídas entre os 4 grupos filogenéticos. Entre as estirpes

de aEPEC os grupos A e B2 somados correspondem a 63,2% das estirpes e para EAEC 68,4%.

5.6 DETECÇÃO DOS GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA DE DEC

A pesquisa dos 10 genes de virulência nas estirpes de DEC mostrou que 57 (86,4%) estirpes contém 1 ou mais genes adicionais de virulência como indicado na TABELA 12. O gene mais frequente entre as estirpes foi *astA* detectado em 31 (47,0%) delas.

TABELA 12 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA POR PATOTIPO DE DEC

Patotipo (N)	Genes de Virulência									
	<i>lha</i>	<i>ehxA</i>	<i>nleE</i>	<i>NleB</i>	<i>KatP</i>	<i>astA</i>	<i>efa1/lifA</i>	<i>pic</i>	<i>aggR</i>	<i>subAB</i>
aEPEC (38)	6	-	14	14	-	21	7	-	-	-
tEPEC (1)	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
STEC (4)	3	3	1	1	1	-	1	-	-	-
EAEC (19)	12	-	-	-	-	8	-	6	18	-
DAEC (3)	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-
EIEC (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Total	23	3	16	16	1	31	8	6	18	0

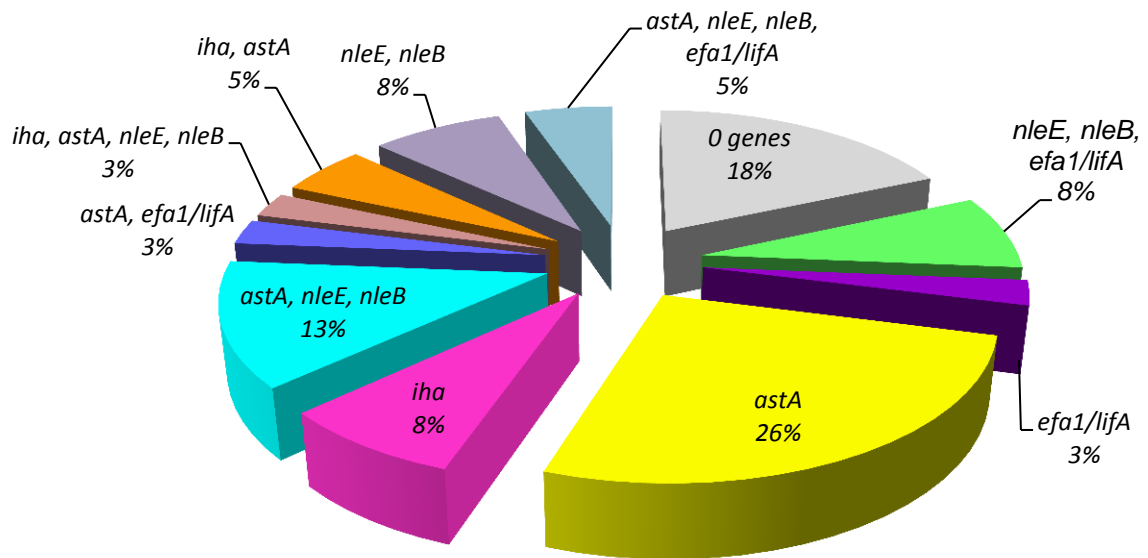
FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: o sinal (-) significa ausência de amplificação.

Nove estirpes (13,7%), incluindo 7 aEPEC, 1 EAEC e 1 DAEC não apresentaram nenhum dos 10 genes testados. A distribuição do total de estirpes de DEC para cada gene de virulência foi de 47% para *astA*, 34,8% para *iha*, 27,3% para *aggR*, 24,2% para *nleE* e *nleB*, 12,1% para *efa1/lifA*, 9,1% para *pic*, 4,5% para *ehxA* e 1,5% para *katP*.

As combinações dos genes de virulência por patotipo estão representados nos GRÁFICOS 2, 3 e 4, exceto para tEPEC que apresentou *nleE* e *nleB* e EIEC que apresentou somente o gene *astA*.

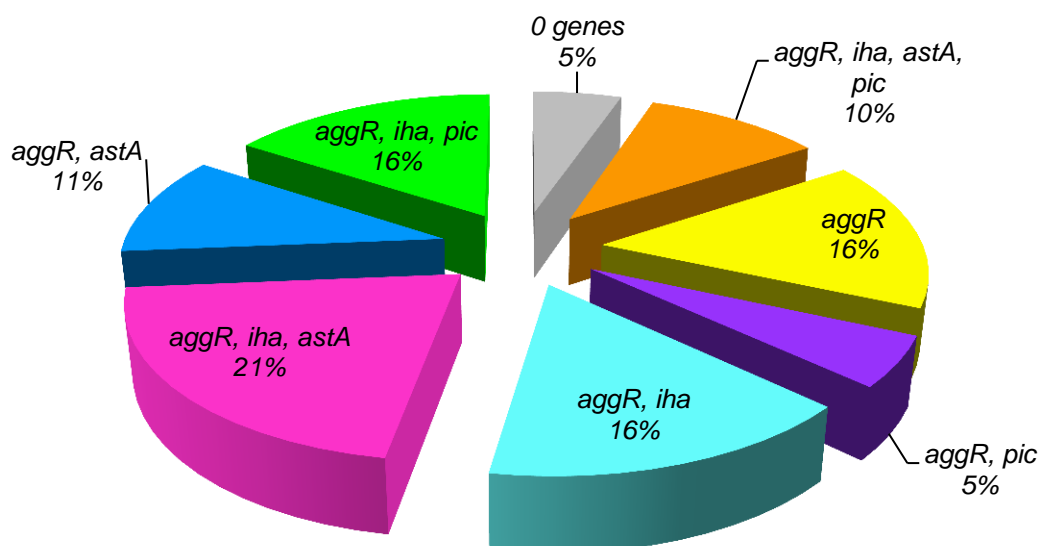
GRÁFICO 2- GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM aEPEC



FONTE: O autor 2016.

Entre as estirpes do patotipo aEPEC, além de eae 31 (82%) estirpes apresentaram um ou mais dos genes adicionais de virulência pesquisados.

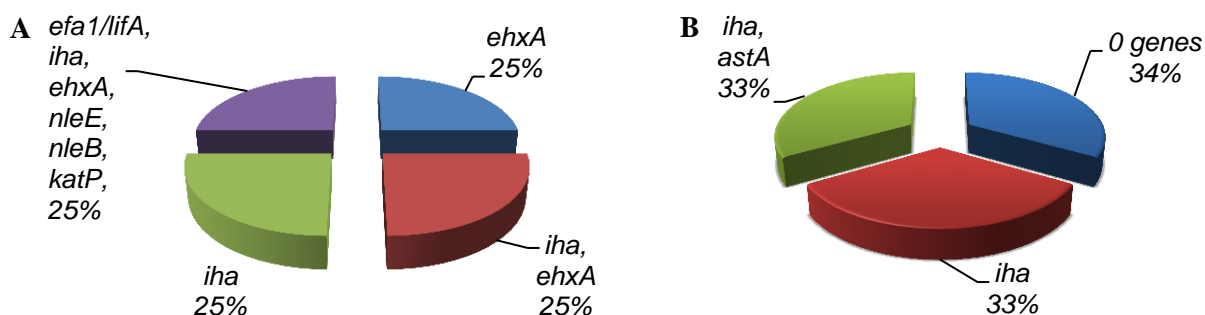
GRÁFICO 3- GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM EAEC



FONTE: O autor 2016.

Entre as estirpes do patotipo EAEC somente uma estirpe não apresentou nenhum dos 10 genes adicionais de virulência pesquisados.

GRÁFICO 4- GENES ADICIONAIS DE VIRULÊNCIA EM STEC E DAEC



FONTE: O autor 2016.

LEGENDA: **A)** Genes adicionais de virulência em STEC. **B)** Genes adicionais de virulência em DAEC.

5.7 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PARA DEC

Dentre as 66 estirpes analisadas 45 (68.2%) foram resistentes a um ou mais dos antimicrobianos testados. Foi encontrada resistência a 6 dos 15 antimicrobianos testados (ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprim, gentamicina e tetraciclina). Resistência mais comum entre as estirpes foi observada para ampicilina (51,5%), cefalotina (39,4%) e tetraciclina (22,7%). Além disso, 21,2% das estirpes foram resistentes ao sulfametoxazol/trimetoprim. Somente uma estirpe foi resistente à ciprofloxacina (1,5%) e duas à gentamicina (3,0%).

As estirpes foram classificadas nos perfis R0 a R15 de acordo com o número e tipo de antimicrobianos aos quais apresentaram resistência, como descrito na TABELA 13. O perfil de cada estirpe em particular está indicado na FIGURA 10.

TABELA 13 – PADRÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE *Escherichia coli* DIARREOGÊNICAS

Antimicrobiano(s)	Patotipo/ (Número de estirpes)	Perfil de Resistência
Nenhum	aEPEC (13), EAEC (6), tEPEC (1), STEC (1)	R0
Ampicilina	aEPEC (5), EAEC (5), DAEC (2)	R1
Ampicilina, Cefalotina	aEPEC (6)	R2
Ampicilina, Cefalotina, Sulfametoxazol/trimetoprim	aEPEC (1), STEC (1), EIEC (1)	R3
Ampicilina, Cefalotina, Sulfametoxazol/trimetoprim, Tetraciclina	aEPEC (4), EAEC (2)	R4
Ampicilina, Sulfametoxazol/trimetoprim	aEPEC (1), DAEC (1)	R5
Ampicilina, Tetraciclina	EAEC (1)	R6
Ampicilina, Cefalotina, Gentamicina	EAEC (2)	R7
Ampicilina, Cefalotina, Ciprofloxacina, Tetraciclina	aEPEC (1)	R8
Sulfametoxazol/trimetoprim	aEPEC (1)	R9
Cefalotina	aEPEC (1), EAEC (1), STEC (2)	R10
Tetraciclina	aEPEC (2)	R11
Sulfametoxazol/trimetoprim, Tetraciclina	aEPEC (1)	R12
Cefalotina, Tetraciclina	aEPEC (1), EAEC (1),	R13
Cefalotina, Tetraciclina, Sulfametoxazol/trimetoprim	aEPEC (1)	R14
Ampicilina, Cefalotina, Tetraciclina	EAEC (1)	R15

FONTE: O autor (2016).

Catorze DEC incluindo 7 aEPEC, 1 STEC e 6 EAEC apresentaram multirresistência incluindo ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina.

5.8 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DE DEC POR PFGE

Para as estirpes de DEC a digestão do DNA cromossomal para a PFGE foi realizada apenas com a enzima *Xba*I. Apenas uma estirpe foi não tipável pela PFGE.

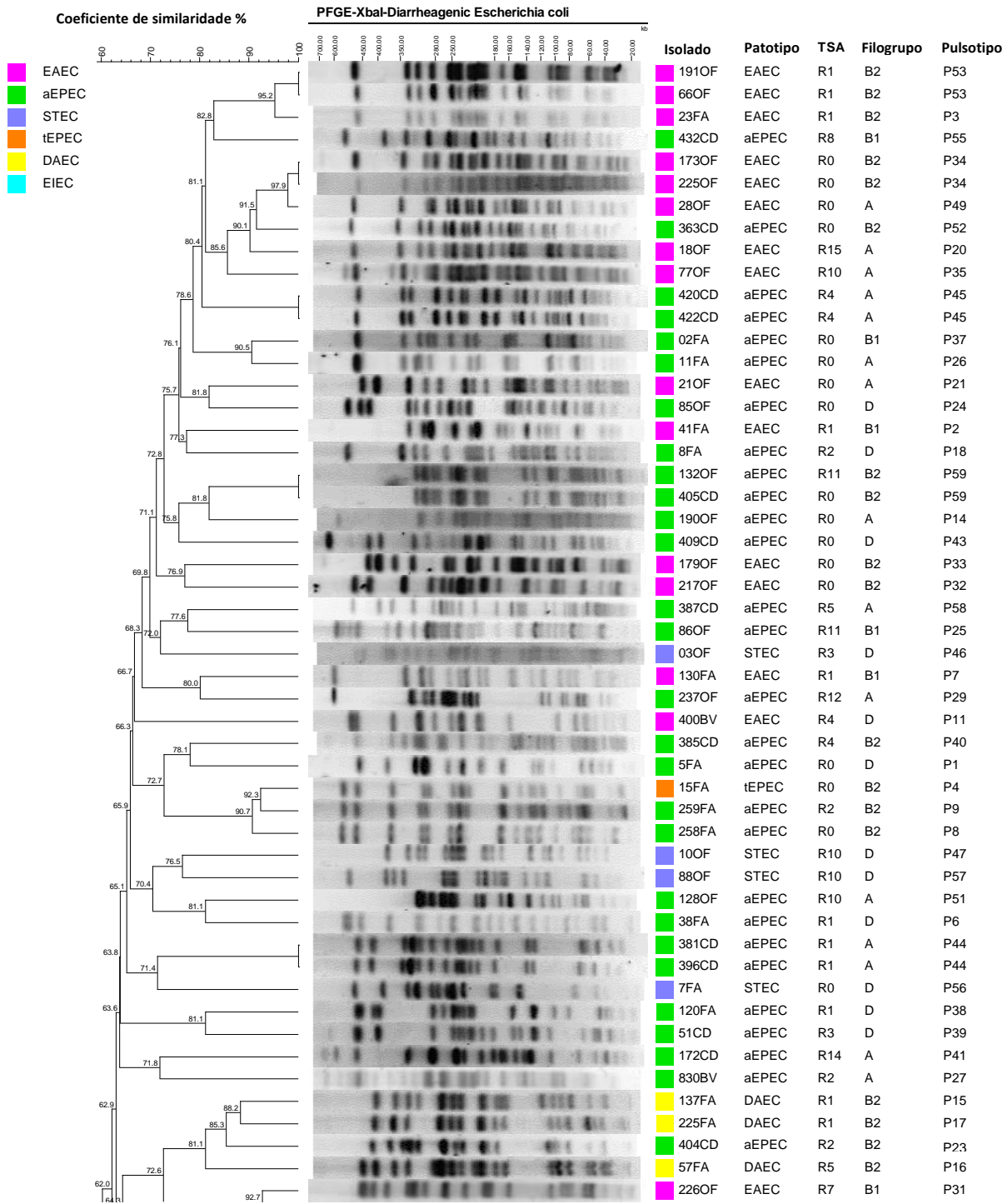
Entre as 65 estirpes de DEC foram observados 59 perfis distintos de PFGE DNA (FIGURA 10), que compreendem de 14-24 bandas com tamanhos variando entre 20,5 e 668 kb. Os perfis foram denominados de P1 a P59 de acordo com o número e tamanho de bandas que possuem.

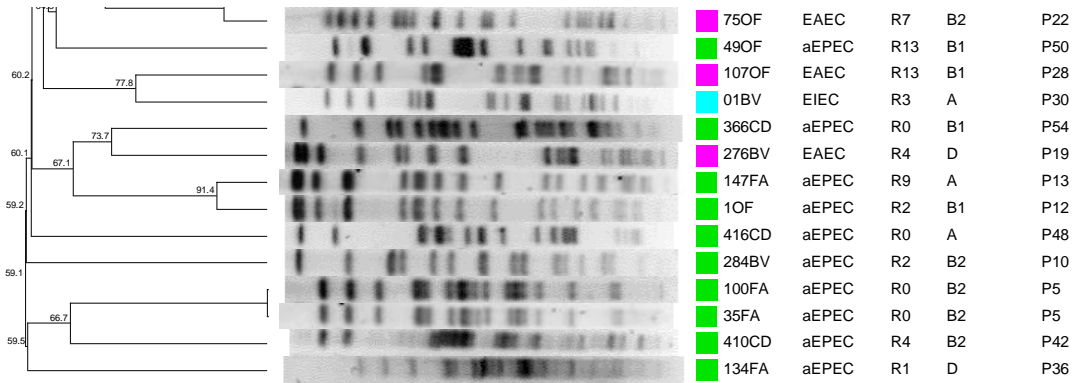
Dentre as estirpes de aEPEC foram encontrados 34 perfis diferentes de bandas, sendo que dentre eles, 4 perfis (P5, P44, P45 e P59) foram compartilhados por duas estirpes cada.

Dentre as 19 estirpes de EAEC, uma foi não tipável pela PFGE (estirpe 245OF). As 18 restantes foram classificadas em 16 perfis distintos, sendo que 2 deles, perfis P34 e P53, foram comuns a duas estirpes cada.

Para os patótipos de STEC e DAEC os perfis gerados foram todos diferentes entre si. As tEPEC e EIEC estão representadas apenas por uma estirpe cada apresentando perfil único de PFGE (FIGURA 10).

FIGURA 10 – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE *Escherichia coli* DIARREOGÊNICAS





FONTE: O autor (2016).
LEGENDA: Dendrograma representando a relação genética entre 65 isolados de *Escherichia coli* diarreogênicas. Os números representam a porcentagem de similaridade entre os isolados com base nos perfis de PFGE. Coluna “isolado” descreve os isolados de DEC; Coluna “Patotipo” representa os patotipos de DEC; Coluna TSA indica os perfis de resistência aos antimicrobianos (R0 a R15); Coluna “Filogrupo” informa os grupos filogenéticos; Coluna “Pulsotipo” designa os perfis de PFGE (P1-P59). Uma estirpe de EAEC foi não tipável por PFGE.

Não foi observada relação entre os perfis de resistência aos antimicrobianos e os perfis de PFGE.

Esses resultados mostram uma grande heterogeneidade genética entre os isolados de DEC. Todas as amostras são provenientes de casos esporádicos de diarreia o que poderia explicar em parte essa diversidade entre os isolados clínicos. E também indica que diversos tipos genéticos dentro de cada patotipo são capazes de provocar infecção.

6 DISCUSSÃO

A análise epidemiológica tem por finalidade avaliar se múltiplos isolados de uma bactéria particular representa a disseminação de um mesmo organismo (clone). Nesse contexto a epidemiologia busca identificar características do isolado que permitam uma avaliação mais acurada. Assim, várias abordagens baseadas na análise de DNA foram desenvolvidas para avaliar o grau de relação genética entre os isolados. Esses métodos têm sido utilizados para tipagem de estirpes na investigação de surtos e também para a análise da população de uma espécie bacteriana ^{178; 179}.

Salmonella é uma das causas mais frequentes de gastroenterite bacteriana aguda, causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo e um grave problema de saúde pública ^{31; 141; 142; 180}.

O desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para a detecção e caracterização de *Salmonella* pode ter um impacto significativo sobre a incidência de doenças causadas por este patógeno ¹⁴⁷.

Neste trabalho a utilização de um método para identificação e sorotipagem molecular simultâneas de *Salmonella* baseado em PCR ¹⁴⁸ mostrou-se adequado para uso na rotina laboratorial. Aliado à extração de DNA pelo método da fervura apresenta bom custo-benefício permitindo a rápida identificação dessas bactérias.

Todos os 46 isolados tiveram sua identificação confirmada como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Enteritidis (33 - 71,7%) ou Typhimurium (13 - 28,3%). Esses são os principais sorotipos isolados em nosso país ^{16; 24; 25; 181; 182} e também em várias outras regiões do mundo ^{144; 180; 183; 184; 185; 186}.

A sorotipagem tradicional é baseada na identificação dos antígenos somático (O) e flagelar (H) através da aglutinação bacteriana com antisoros específicos ^{146; 147; 152}. No entanto, a sorotipagem tem várias desvantagens tais como reações falso positivas resultantes de aglutinação fraca ou inespecífica, isolados não tipáveis devido à auto-aglutinação e perda da expressão do antígeno em estirpes rugosas e imóveis, além do custo dos antisoros ^{147; 152}.

Considerando que *Salmonella enterica* apresenta cerca de 2500 sorotipos, os métodos de sorotipagem por PCR ainda são limitados uma vez que até o momento foram desenvolvidos testes para o reconhecimento de um número restrito de sorotipos. No entanto, esses ensaios permitem a identificação dos sorotipos mais

comuns de *Salmonella* e vários ensaios de PCR-multiplex estão descritos na literatura^{147; 148; 149}.

Além disso, a identificação baseada em PCR do gênero e dos sorotipos mais frequentes em cada região geográfica pode permitir um diagnóstico confiável, rápido e custo efetivo de *Salmonella* além de ser um suporte valioso para o monitoramento epidemiológico. Isso é ainda mais importante em regiões como a nossa onde a sorotipagem não é realizada de rotina.

Neste estudo foram analisadas estirpes isoladas de doentes envolvidos em 9 surtos de diarreia notificados no Paraná no período compreendido entre junho de 2010 a fevereiro de 2013. Oito dos 9 surtos foram associados à *Salmonella* Enteritidis. A predominância desse sorotipo em surtos de doenças de origem alimentar foi também observada no Brasil por outros autores^{16; 24; 187} e foi também descrito em outros países^{31; 188}.

A sorotipagem de *Salmonella* é útil nos programas de vigilância como ponto de partida para a identificação do patógeno, confirmação e rastreamento da fonte de surtos, além de permitir também uma comparação mundial^{147; 152; 183; 189}.

No entanto, a sorotipagem não fornece o nível de discriminação requerido para as investigações de surtos, uma vez que não possui capacidade suficiente para determinar o *fingerprint* das estirpes^{147; 152}.

Os métodos de tipagem devem ser capazes não só de identificar estirpes associadas a surtos, mas também de distinguir entre estirpes de um mesmo sorotipo que são estreitamente relacionadas, mas geneticamente distintas o que requer um sistema de tipagem de alta resolução¹⁵⁸.

Diversos métodos moleculares de tipagem vêm sendo utilizados, mas devido à alta capacidade discriminatória, robustez e reprodutibilidade a PFGE é considerada o padrão ouro para subtipagem de enteropatógenos^{147; 176}.

No entanto, a PFGE é uma técnica demorada e trabalhosa além de não exibir a mesma sensibilidade com todos os sorotipos¹⁴⁷.

MAPLT é uma metodologia desenvolvida mais recentemente. É baseada em PCR para a detecção de *loci* de fagos encontrados no genoma de *Salmonella*¹⁵⁹. É uma técnica rápida e fácil de realizar além de não requerer equipamento especializado o que é uma vantagem em relação à PFGE. Além disso, a utilização de metodologia baseada em PCR pode ser útil em investigações de surtos onde a fonte deve ser rapidamente identificada^{158; 190}.

MAPLT mostrou boa resolução quando testado com isolados de *Salmonella* fenotipicamente relacionados, mas epidemiologicamente distintos apresentando maior discriminação em termos de número de perfis que os gerados pela PFGE^{159;}¹⁶⁰ ou pelo menos igual¹⁵⁸.

No presente estudo foram selecionados 7 entre os *loci* de fagos que apresentaram resultados mais discriminatório entre *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Typhimurium^{159; 160; 168}. No entanto, enquanto 3 perfis de PFGE foram observados para *Salmonella* Enteritidis, somente 1 foi observado pelo MAPLT (FIGURA 5; FIGURA 8) indicando que o ensaio não foi capaz de diferenciar essas estirpes. Para o sorotipo *Salmonella* Typhimurium, 8 perfis de PFGE foram encontrados contra 3 de MAPLT (FIGURA 5), também indicando que o último ensaio apresenta menor poder discriminatório que a PFGE. Esses dados se contrapõem aos apresentados por Ross e Heuzenroeder^{159; 160} e Ross, Parkinson e Heuzenroeder¹⁶⁸ que mostraram um maior poder discriminatório do MAPLT.

Muitas vezes, *loci* particulares não fornecem diversidade alélica suficiente para a separação máxima de isolados¹⁵⁸. Além disso, é possível que um maior número e/ou um conjunto diferente de *primers* para MAPLT possam permitir uma melhor discriminação.

Também é relevante considerar que a PFGE demonstrou uma baixa habilidade discriminatória ($D = 0,32$) para *Salmonella* Enteritidis detectando somente 3 grupos entre as 33 estirpes as quais apresentaram coeficiente de similaridade de Dice de 94,6% (FIGURA 5). Esses resultados indicam que essas estirpes são altamente relacionadas geneticamente. Uma elevada similaridade entre isolados de *Salmonella* Enteritidis tem sido observada em outros estudos^{25; 191; 192}, indicando a natureza clonal da bactéria, o que poderia justificar o baixo índice de discriminação observado.

As estirpes que apresentaram o perfil PA de PFGE (FIGURA 5) foram associadas com 7 de 8 surtos causados por *Salmonella* Enteritidis. Ainda existem poucos estudos sobre tipagem molecular de isolados de *Salmonella* no Brasil^{26; 27; 28;}²⁹, mas aparentemente o mesmo perfil de PFGE (PA) foi também o mais comum entre as estirpes de *Salmonella* Enteritidis associadas com surtos de origem alimentar ocorridos no estado do Rio Grande do Sul²⁵, sugerindo a propagação de um clone da bactéria entre humanos no sul do país.

Além disso, esse perfil foi observado na maioria das estirpes de *Salmonella* Enteritidis isoladas de pacientes com casos esporádicos de diarreia em Taiwan ¹⁹³ onde foi designado como perfil X3. Esse foi também o pulsotipo mais comum encontrado num estudo multi-centro internacional incluindo 9 países Europeus designado como SENTXB.0001 naquele estudo ¹⁹⁴. Esses dados sugerem que estirpes de *Salmonella* Enteritidis apresentando esse perfil de PFGE são amplamente disseminadas ao redor do mundo.

Em relação às alternativas para tratamento apenas 4 estirpes de *Salmonella* foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. A principal resistência apresentada foi ao ácido nalidíxico (84,7%) seguida por tetraciclina (10,9%), ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e cloranfenicol (6,5% cada). Maragkoudakis et al ¹⁹⁵ observaram a emergência da resistência à ampicilina, cloranfenicol e ácido nalidíxico em estirpes de *Salmonella* isoladas no período de 2007-2010 na Grécia. Este padrão de resistência é similar aos resultados observados nas estirpes analisadas no presente trabalho. Em um estudo realizado em Salvador (BA), Diniz-Santos et al ¹⁹⁶ mostraram que estirpes de *Salmonella* isoladas de crianças com diarreia, apresentaram resistência à ampicilina, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim. Em nosso estudo não foi observada resistência à ciprofloxacina entre as estirpes isoladas, no entanto, resistência à ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim foram frequentes. Estes resultados indicam que a resistência a drogas é comum entre *Salmonella*, mas sugerem que há diferenças no perfil de resistência de diferentes regiões geográficas.

Três estirpes de *Salmonella* do sorotipo Typhimurium apresentaram resistência à 3 ou mais antimicrobianos de classes distintas (multirresistência) incluindo ácido nalidíxico, ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol (TABELA 10), o que reduz as alternativas terapêuticas para pacientes que requeiram tratamento.

A análise filogenética mostrou que a maioria das estirpes de DEC analisadas pertence aos grupos A e B2. A predominância do grupo filogenético entre DEC pode variar de acordo com o país e região. Estudos realizados na Colômbia ¹⁹⁷, Líbia ³⁸ e Costa Rica ³⁹ mostraram que a maioria dos isolados pertencia aos grupos A e B1 totalizando 55%, 70% e 64% respectivamente.

Entre os dois patótipos com maior número de isolados, aEPEC e EAEC, as estirpes foram distribuídas entre os 4 grupos filogenéticos predominando os grupos A e B2. Diferentes estudos mostram variação na distribuição das DEC entre os grupos filogenéticos com aEPEC classificadas principalmente nos grupos A e B1 e B2 enquanto que EAEC varia igualmente dentro dos 4 grupos filogenéticos ^{38; 39; 40}. Embora aparentemente haja predomínio dos grupos B2 e A na amostra analisada, estudos com maior número de isolados devem ser realizados para esclarecer a distribuição das DEC nos grupos filogenéticos.

A pesquisa dos genes acessórios de virulência permitiu verificar que em cada patótipo existem diferentes combinações, o que pode contribuir de forma distinta para a virulência de cada estirpe além de mostrar heterogeneidade entre elas.

O gene *aggR* que codifica para o regulador de um conjunto de genes de virulência de EAEC ¹²⁸ foi detectado apenas entre as estirpes deste patótipo (TABELA 12). Na maior parte das EAEC analisadas (95%) foi observada a amplificação de um fragmento de *aggR*, o que permite que sejam classificadas como EAEC típicas. Apenas uma EAEC não apresentou esta característica. Diversos estudos, realizados no Brasil e no exterior, tem mostrado que as EAEC típicas estão mais frequentemente associadas com diarreia ^{198; 199; 200; 201}. No entanto, na amostra analisada neste estudo, exceto pela estirpe atípica que foi isolada de controle saudável, as demais foram igualmente distribuídas entre doentes e controles.

Entre as estirpes de EAEC também foi detectado o gene *pic*. O produto deste gene, encontrado em apenas 6 estirpes de EAEC em nosso estudo, confere à bactéria vantagens na colonização do intestino do hospedeiro uma vez que tem atividade de mucinase. Além disso, facilita a formação de biofilme por induzir a hipersecreção de muco ^{125; 134}. Estudos mostram uma grande variação na frequência deste gene entre as estirpes de EAEC. No Brasil, uma análise realizada entre estirpes desse patótipo provenientes de cinco diferentes regiões do país, mostra o gene *pic* com uma frequência de 16% ²⁰² enquanto que em outro estudo realizado em São Paulo, a frequência foi de 48% ¹⁹⁸. Essa mesma diversidade em relação à frequência de *pic* em EAEC foi observada em estirpes de outros países, nas quais variou entre 12% a 88,9% ^{38; 203; 204; 205}.

Entre as 66 estirpes de DEC analisadas, o gene que apresentou maior frequência foi o *astA*. Este gene codifica para a enterotoxina de EAEC (EAST1) que foi inicialmente associada com diarreia aquosa ^{125; 206}. No entanto isso é controverso uma vez que esse gene tem sido encontrado em *E.coli* comensais e há estudos mostrando uma associação negativa em diarreia ^{125; 169}. O gene *astA* foi detectado entre as estirpes de EAEC, mas também em aEPEC, DAEC e EIEC. Estudos prévios reportaram que *astA* não é restrito a isolados de EAEC podendo ser encontrada nos outros 6 patotipos (tEPEC, aEPEC, EAEC, STEC, EIEC e DAEC) e associado com diarreia ^{81; 207; 208; 209; 210}.

O gene que codifica para a toxina multifatorial, *efa1/lifA*, foi detectado com baixa frequência entre as estirpes de aEPEC e STEC analisadas. O produto deste gene tem função tanto de adesina, importante na adesão às células epiteliais, hemaglutinação e auto agregação dessas estirpes, quanto de toxina que inibe a ativação de linfócitos e foi associado com o desenvolvimento da diarreia e complicações sistêmicas ^{69; 70; 71}. Entre as DEC analisadas, aEPEC foi o patotipo no qual foi observada maior frequência deste gene. Em estudos realizados no Brasil *efa1/lifA* foi detectado em estirpes de aEPEC e tEPEC com taxas de positividade que variam de 20% a 62% ^{104; 208; 211; 212}.

O segundo gene presente em maior frequência nas DEC foi o *iha*, cujo produto, é uma proteína de adesão envolvida na colonização bacteriana ¹⁰³. Embora este gene tenha sido inicialmente descrito em estirpes do patotipo STEC ¹⁰¹, no presente estudo ele foi detectado em estirpes de STEC, aEPEC, EAEC e DAEC. A presença do gene *iha* em estirpes de outros patotipos que não STEC foi relatada também por outros autores. Scaletsky et al ¹⁰⁴ foram os primeiros a reportarem a presença de *iha* em estirpes do patotipo aEPEC isoladas crianças de diferentes cidades brasileiras, numa frequência de 21,7%. Dos santos et al ¹⁰⁵ também reportaram a presença de *iha* em estirpes de EAEC isoladas de casos de diarreia no Brasil com uma frequência de 67%, frequência similar à encontrada nesse estudo (63,2% em EAEC).

Os genes *nleE* e *nleB* foram mais frequente no patotipo aEPEC (36.8%). Os resultados relatados por Scaletsky et al ¹⁰⁴ indicam frequência de 36,9% para *nleE* e *nleB* em aEPEC valor semelhante ao aqui encontrado. Assim como no estudo realizado por Afset et al ¹⁶⁹ os genes *nleE* e *nleB* foram detectados sempre juntos

nas estirpes, o que é consistente com a localização no cromossomo de EPEC e EHEC ^{169; 213}.

Os genes *ehxA* e *katP* foram detectados em baixa frequência e apenas entre as STEC (TABELA 12). Tanto *ehxA* quanto *katP* são codificados no plasmídeo pO157 presente em algumas estirpes de STEC ⁹⁹ e a frequência baixa poderia ser atribuída ao pequeno número amostral desse patotipo no presente estudo.

Portanto, enquanto os genes *aggR* e *pic*, *katP* e *ehxA* foram associados de modo restrito a EAEC e STEC respectivamente, *iha*, *nleE*, *nleB* e *astA* apresentaram uma distribuição mais ampla entre os patotipos de DEC.

A virulência é uma característica multifatorial e diversos genes são codificados em plasmídeos, fagos e ilhas de virulência ^{13;14}. A transmissão horizontal desses genes entre as bactérias poderia, em parte, justificar a heterogeneidade na distribuição dessas características entre as estirpes analisadas.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos revelou que grande parte das estirpes (68.2%) foi resistente a um ou mais dos antimicrobianos testados sendo a resistência à ampicilina a mais comum. Esses dados corroboram com estudos prévios realizados no Brasil nos quais a resistência à ampicilina está entre as principais nos isolados de DEC ^{214; 215; 216}. A resistência à cefalotina e tetraciclina foi observada em 22.7% e 39.5% das estirpes de DEC respectivamente. Estudos realizados no Brasil e em outros países mostram resistência frequentemente elevada à tetraciclina entre os isolados de DEC ^{214; 215; 217; 218}, porém, a resistência à cefalotina, também relatada por outros autores, parece ser menos comum ^{215; 219; 220}. Esses dados mostram que a resistência observada entre as estirpes de *E.coli* diarreogênicas isoladas no Paraná segue um padrão a quatro drogas principais (ampicilina, cefalotina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim), deixando dessa forma, várias opções de terapia, quando esta se fizer necessária.

Entre as estirpes de aEPEC quatro perfis de PFGE foram compartilhados por duas estirpes cada um: P5 compreende as estirpes 100FA e 35FA, P44 381CD e 396CD, P45 420CD e 422CD e P59 132OF e 405CD (FIGURA 10). Todas essas estirpes foram isoladas de pessoas com casos esporádicos de diarreia, não de surtos e apresentam também outras características em comum. As estirpes 100FA e 35FA pertencem ao grupo filogenético A, não apresentam resistência a nenhum

antimicrobiano testado e apresentam o mesmo perfil de virulência exibindo apenas *astA*. O mesmo vale para as estirpes 381CD e 396 CD que pertencem ao grupo filogenético A e perfil de resistência R1 (ampicilina) e presença apenas de *astA* como gene adicional de virulência. As estirpes 420CD e 422CD também foram indistinguíveis, pertencem ao grupo filogenético A, apresentam o perfil de resistência R4 e contêm os genes *astA* e *iha*. Portanto essas bactérias constituem 3 clones. Por outro lado, as estirpes 132OF e 404CD que apresentam o mesmo perfil de PFGE P59, pertencem ao grupo filogenético B2 e contêm os genes de resistência *astA*, *nleE*, *nleB*, *efa1/lifA*, diferem em relação a resistência aos antimicrobianos. Enquanto 404CD foi sensível a todos os antimicrobianos testados, a estirpe 132OF apresentou resistência à tetraciclina. Entretanto os resultados dos testes moleculares sugerem que ambas pertencem a um mesmo clone. Não podemos descartar a possibilidade de que o gene de resistência seja codificado em plasmídeo cujo tamanho seja abaixo da faixa analisada na PFGE e que tenha sido perdido na estirpe 404CD.

Entre as EAEC, também foram observadas bactérias que apresentaram mesmo perfil de PFGE. O perfil P34 contém as estirpes 173OF e 225 OF, ambas suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, pertencentes ao grupo filogenético B2 e perfil de virulência *aggR*, *iha* e *pic*. No perfil P53 estão as estirpes 191OF e 66OF que também pertencem ao grupo filogenético B2, apresentam resistência à ampicilina e tem perfil de virulência *aggR*, *astA* e *iha*. Portanto representam 2 clones que estão associados com diarreia esporádica.

Nenhuma relação foi observada entre os perfis do PFGE e os genes de virulência presentes nas estirpes analisadas.

7 CONCLUSÕES

Dois sorotipos de *Salmonella* foram encontrados, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis que foi o sorotipo predominante.

Foram identificados 3 perfis de PFGE para *Salmonella* Enteritidis e 8 para *Salmonella* Typhimurium.

Salmonella Enteritidis perfil PA/P1/M1/R1 foi prevalente nos casos esporádicos e surtos de diarreia notificados.

Salmonella Enteritidis analisadas apresentaram elevada similaridade genética (94,6%), o que está relacionado com o baixo número de perfis observados na PFGE e MAPLT.

Salmonella Typhimurium apresentou maior diversidade

A subtipagem por MAPLT foi menos discriminatória que PFGE.

Todas as estirpes de *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência somente ao ácido nalidíxico restando, portanto diversas alternativas para o tratamento das infecções por essa bactéria.

Entre as estirpes de *Salmonella* Typhimurium foram encontradas bactérias susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, bem como multirresistentes.

As DEC foram classificadas entre os 4 grupos filogenéticos, mas predominantemente A e B2.

A presença de um ou mais genes de virulência adicionais foi detectada em 88% das DEC sendo *astA* o mais comum.

Resistência a um ou mais antimicrobianos foi observada em 68,2% das DEC, sendo a resistência à ampicilina a mais comum.

Multirresistência foi observada em 21% das DEC.

Uma elevada diversidade genética foi observada entre as DEC, com relação aos perfis de PFGE, classificação filogenética e distribuição dos genes de virulência.

Os resultados deste trabalho trazem informações importantes sobre a epidemiologia das infecções causadas por *Salmonella* e DEC no estado do Paraná.

REFERÊNCIAS

- 1 UNICEF; WHO. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **WHO**, 2009. Disponível em: < http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241598415/en/ >. Acesso em: 18 Sep 2014.
- 2 JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Revisiting bacterial gastroenteritis, Part I: issues, possible approaches, and an ever-expanding list of etiologic agents. **Clin Microbiol Newsletter**, v. 33, n. 10, p. 71-76, May 2011.
- 3 CDC. Global diarrhea burden. **Diarrhea: common illness, global killer**, Atlanta, GA, USA, 2015. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html#one> >. Acesso em: 12 May 2016.
- 4 LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2151-61, Jun 2012.
- 5 ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 4, p. 507-17, Apr 2006.
- 6 YONGSI, H. B. Pathogenic microorganisms associated with childhood diarrhea in low-and-middle income countries: case study of Yaounde - Cameroon. **Int J Environ Res Public Health**, v. 5, n. 4, p. 213-29, Dec 2008.
- 7 LOUREIRO, E. C. B. et al. Detection of enteropathogenic bacteria and enteroparasites in patients with acute diarrhea in Juruti, Pará, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 1, p. 143-148, Mar 2010.
- 8 COHEN, M. B. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J Pediatr**, v. 146, n. 1, p. 54-61, Jan 2005.
- 9 QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 3, p. 465-83, Jul 2005.
- 10 NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998.
- 11 SCHMIDT, M. A. LEeways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. **Cell Microbiol**, v.12, n.11, p.1544-52, Aug 2010.
- 12 HUANG, D. B. et al. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 10, p. 1303-11, Oct 2006.

- 13 KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, Feb 2004.
- 14 CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 26-38, Feb 2010.
- 15 GALANIS, E. et al. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 381-8, Mar 2006.
- 16 MÜRMANN, L. et al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 529-34, Jul 2008.
- 17 O'BRIEN, S. J. et al. Surveillance of foodborne outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992-1999: contributing to evidence-based food policy? **P Health**, v. 116, n. 2, p. 75-80, Mar 2002.
- 18 ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Spices and herbs as source of *Salmonella* - related foodborne diseases. **Food Res Int**, v. 45, n. 2, p. 765-769, 2012.
- 19 FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to Succeed in the host: virulence and regulation. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 2, p. 308-341, Apr 2013.
- 20 VAN BELKUM, A. et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 3, p. 547-60, Jul 2001.
- 21 GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 7, p. 866-75, Oct 2010.
- 22 MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 66, n. 1, p. 50-7, Jan 2010.
- 23 FIALHO, O. B. et al. Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* Using a Two-System Multiplex-PCR Protocol. **J Clin Lab Anal**, v. 27, p. 155-161, Feb 2013.
- 24 ASSIS, F. E. A. et al. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, southern Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 12, p. 1609-1614, Dec 2014.
- 25 OLIVEIRA, F. A. et al. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. **Food Res Int**, v. 45, n. 2, p. 1000–1003, March 2012.
- 26 GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulse types of *Salmonella* Typhimurium, in

Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 281-6, May 2006.

- 27 OLIVEIRA, F. A. D. et al. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Cont**, v. 20, n. 6, p. 606–610, June 2009.
- 28 KOTTWITZ, L. B. M. et al. Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 7, p. 1026-31, Jul 2011.
- 29 CAMPIONI, F.; MORATTO BERGAMINI, A. M.; FALCAO, J. P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 254-64, Dec 2012.
- 30 WHO. Diarrhoeal disease. **WHO**, 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/> >. Acesso em: 02 Feb 2016.
- 31 CDC. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report**. US Department of Health and Human Services, CDC. Atlanta, Georgia, p.1-15. 2015.
- 32 MS (Ministério da Saúde) et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos – VE-DTA. **MS**, São Paulo, 2014. Disponível em:< http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 04 Jun 2016.
- 33 MS (Ministério da Saúde) et al. Doenças transmitidas por alimentos. **MS**, 2015. Disponível em: < http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresentacao_dos_dados_gerais-DTA-2015.pdf >. Acesso em: 09 Apr 2016.
- 34 NATARO, J. K. et al. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P. R., ET AL (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8. Washington D.C: ASM Press, v.1, 2007. p.670-687.
- 35 WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli* In: TORRES, A. G. (Ed.). **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. University of Texas, USA: Bentham Science Publishers Ltd., 2010. cap. 2, p.8-24.
- 36 SOUZA, V. et al. Genetic structure of natural populations of *escherichia coli* in wild hosts on different continents. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 8, p. 3373-85, Aug 1999.
- 37 HERZER, P. J. et al. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli* . **J Bacteriol**, v. 172, n. 11, p. 6175-81, Nov 1990.

- 38 ALI, M. M. et al. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from Libya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 866-71, May 2012.
- 39 PEREZ, C.; GOMEZ-DUARTE, O. G.; ARIAS, M. L. Diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Costa Rica. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 2, p. 292-7, Aug 2010.
- 40 USEIN, C. R. et al. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in Romanian children younger than 5 years of age. **Jpn J Infect Dis**, v. 62, n. 4, p. 289-93, Jul 2009.
- 41 SALMANI, H. et al. Pathotypic and phylogenetic study of diarrheagenic *Escherichia coli* and uropathogenic *E. coli* using multiplex polymerase chain reaction. **Jundishapur J Microbiol**, v. 9, n. 2, Feb 2016.
- 42 BERGTHORSSON, U.; OCHMAN, H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. **Mol Biol Evol**, v. 15, n. 1, p. 6-16, Jan 1998.
- 43 WALK, S. T. et al. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environ Microbiol**, v. 9, n. 9, p. 2274-88, Sep 2007.
- 44 GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiol**, v. 149, n. Pt 12, p. 3575-86, Dec 2003.
- 45 CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4555-8, Oct 2000.
- 46 GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environ Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2484-96, Oct 2008.
- 47 CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 214-26, Mar 2012.
- 48 LEE, J. et al. Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 2088-102, Jun 2010.
- 49 RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud pública Méx**, v. 44, n. 5, p. 464-475, Sep 2002.
- 50 PIAZZA, R. M. F. et al. Detection and subtyping methods of diarrheagenic *Escherichia coli* strains. In: TORRES, A. G. (Ed.). **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. University of Texas, USA: Bentham Science Publishers Ltd, 2010. cap. 7, p.95-115.

- 51 CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* . **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 822-80, Oct 2013.
- 52 SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect Immun**, v. 45, n. 2, p. 534-6, Aug 1984.
- 53 TOBE, T. et al. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **infect Immun**, v. 67, n. 10, p. 5455-62, Oct 1999.
- 54 DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* . **Infect Immun**, v. 60, n. 10, p. 3953-61, Oct 1992.
- 55 FRANKEL, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : more subversive elements. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 5, p. 911-21, Dec 1998.
- 56 DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* . **J Clin Invest**, v. 107, n. 5, p. 539-48, Mar 2001.
- 57 SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 1, p. 14-56, Jan 2004.
- 58 ADU-BOBIE, J. et al. Detection of intimins α , β , γ , and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 662-8, Mar 1998.
- 59 DEAN, P.; KENNY, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. **Curr Opin Microbiol**, v.12, p.101-9, Feb 2009.
- 60 DENG, W. et al. Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 692-709, Sep 2012.
- 61 NEWTON, H. J. et al. The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 5, p. e1000898, May 2010.
- 62 IGUCHI, A. et al. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. **J Bacteriol**, v. 191, n. 1, p. 347-54, Jan 2009.
- 63 WICKHAM, M. E. et al. *Citrobacter rodentium* virulence in mice associates with bacterial load and the type III effector NleE. **Microbes Infect**, v. 9, n. 3, p. 400-7, Mar 2007.

- 64 ZURAWSKI, D. V. et al. The NleE/OspZ family of effector proteins is required for polymorphonuclear transepithelial migration, a characteristic shared by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* infections. **Infect Immun**, v. 76, n. 1, p. 369-79, Jan 2008.
- 65 TSENG, T. T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiol**, v. 9, n. Suppl 1, p. S2, Feb 2009.
- 66 FRONZES, R.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G. The structural biology of type IV secretion systems. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 10, p. 703-14, Oct 2009.
- 67 REDDICK, L. E.; ALTO, N. M. Bacteria fighting back: how pathogens target and subvert the host innate immune system. **Mol Cell**, v. 54, n. 2, p. 321-8, Apr 2014.
- 68 VOSSenkAMPER, A. et al. Inhibition of NF-kappaB signaling in human dendritic cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein NleE. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 4118-27, Oct 2010.
- 69 KLAPPROTH, J. M. A. et al. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. **Infect Immun**, v. 68, n. 4, p. 2148-55, Apr 2000.
- 70 NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Mol Microbiol**, v. 35, n. 2, p. 275-88, Jan 2000.
- 71 KLAPPROTH, J. M. A. The role of lymphostatin/EHEC factor for adherence-1 in the pathogenesis of gram negative infection. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 5, p. 954-62, May 2010.
- 72 JAMES, S. P.; KLAPPROTH, J. M. Major pathways of mucosal immunity and inflammation: cell activation, cytokine production and the role of bacterial factors. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 10 Suppl 2, p. 1-9, 1996.
- 73 STEVENS, M. P. et al. Efa1 Influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5158-5166, Sep 2002.
- 74 ABU-MEDIAN, A. B. et al. Functional analysis of lymphostatin homologues in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* . **FEMS Microbiol Lett**, v. 258, n. 1, p. 43-9, May 2006.
- 75 DEACON, V. et al. Efa-1/LifA mediates intestinal colonization of calves by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26 : H- in a manner independent of glycosyltransferase and cysteine protease motifs or effects on type III secretion. **Microbiol**, v. 156, n. Pt 8, p. 2527-36, Aug 2010.

- 76 TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* . **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 5, p. 508-13, May 2002.
- 77 CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiol**, v. 150, n. Pt 3, p. 527-38, Mar 2004.
- 78 AFSET, J. E. et al. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 11, p. 1137-44, Nov 2004.
- 79 ESTRADA-GARCIA, T. et al. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among mexican children and association of atypical enteropathogenic *e. coli* with acute diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 93-8, 2009.
- 80 SCALETISKY, I. C. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect Immun**, v. 67, n. 7, p. 3410-5, Jul 1999.
- 81 DULGUER, M. V. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J Infect Dis**, v. 188, n. 11, p. 1685-94, Dec 1 2003.
- 82 CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups-a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-52, Oct 2004.
- 83 TENNANT, S. M. et al. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 117, 2009.
- 84 RILEY, L. W. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. **Annu Rev Microbiol**, v. 41, p. 383-407, Oct 1987.
- 85 KARMALI, M. A. et al. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, v. 1, n. 8325, p. 619-20, Mar 1983.
- 86 O'BRIEN, A. O. et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet**, v. 1, n. 8326 Pt 1, p. 702, Mar 1983.
- 87 PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 450-79, Jul 1998.

- 88 O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol Rev**, v. 51, n. 2, p. 206-20, Jun 1987.
- 89 TZIPORI, S. et al. Antibody Therapy in the management of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 926-41, 2004.
- 90 JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. AND NEWLAND, J. W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiology Letters**, v. 44, n. 1, p. 109–114, Sep 1987.
- 91 PATON, A. W. et al. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli* . **J Exp Med**, v. 200, n. 1, p. 35-46, Jul 2004.
- 92 PATON, A. W.; PATON, J. C. *Escherichia coli* Subtilase Cytotoxin. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 2, p. 215-28, Feb 2010.
- 93 HOLLAND, I. B.; SCHMITT, L.; YOUNG, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). **Mol Membr Biol**, v. 22, n. 1-2, p. 29-39, Jan-Apr 2005.
- 94 BAUER, M. E.; WELCH, R. A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 167-75, Jan 1996.
- 95 SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect Immun**, v. 63, n. 3, p. 1055-61, Mar 1995.
- 96 PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO*₁₁₁, and *rfbO*₁₅₇. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 2, p. 598-602, Feb 1998.
- 97 ALDICK, T. et al. Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin. **Mol Microbiol**, v. 71, n. 6, p. 1496-508, Mar 2009.
- 98 BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiol**, v. 142 (Pt 11), p. 3305-15, Nov 1996.
- 99 LIM, J. Y.; YOON, J. W.; HOVDE, C. J. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. **J Microbiol Biotechnol**, v. 20, n. 1, p. 5-14, Jan 2010.
- 100 LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **J Appl Microbiol**, v. 88, n. 5, p. 729-45, May 2000.

- 101 TARR, P. I. et al. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect Immun**, v. 68, n. 3, p. 1400-7, Mar 2000.
- 102 JOHNSON, J. R. et al. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 2, p. 965-71, Feb 2005.
- 103 MCWILLIAMS, B. D.; TORRES, A. G. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 3, Jun 2014.
- 104 SCALETISKY, I. C. A. et al. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 11, p. 3756-9, Nov 2009.
- 105 DOS SANTOS, L. F. et al. Distinct pathotypes of O113 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 6, p. 2028-30, Jun 2007.
- 106 SHAH, N.; DUPONT, H. L.; RAMSEY, D. J. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 4, p. 609-14, Apr 2009.
- 107 JIANG, Z. D. et al. Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 1417-9, Apr 2010.
- 108 WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* . **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 4, p. 569-84, Oct 1997.
- 109 SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol Rev**, v. 56, n. 4, p. 622-47, Dec 1992.
- 110 GILL, D. M.; RICHARDSON, S. H. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* : comparison with cholera toxin. **J Infect Dis**, v. 141, n. 1, p. 64-70, Jan 1980.
- 111 SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Rev**, v. 60, n. 1, p. 167-215, Mar 1996.
- 112 LUCAS, M. L. Diarrhoeal disease through enterocyte secretion: a doctrine untroubled by proof. **Exp Physiol**, v. 95, n. 4, p. 479-84, Apr 2010.
- 113 PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiol Lett**, v. 252, n. 1, p. 11-8, Nov 2005.

- 114 MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- 115 SANSONETTI, P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. **Gut**, v. 50 Suppl 3, p. Iii2-8, May 2002.
- 116 BESSESEN, M. T. et al. Enteroinvasive *Escherichia coli*: a cause of bacteremia in patients with AIDS. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 11, p. 2675-7, Nov 1991.
- 117 LUSCHER, D.; ALTWEGG, M. Detection of *Shigellae*, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. **Mol Cell Probes**, v. 8, n. 4, p. 285-90, Aug 1994.
- 118 ASHIDA, H. et al. *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. **Mol Microbiol**, v. 63, n. 3, p. 680-93, Feb 2007.
- 119 SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 264-292, Jan 2005.
- 120 SPANO, L. C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 3, p. 359-63, Mar 2008.
- 121 LE BOUGUENEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiol Lett**, v. 256, n. 2, p. 185-94, Mar 2006.
- 122 BETIS, F. et al. The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1068-74, Mar 2003.
- 123 NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, n. 9, p. 829-31, Sep 1987.
- 124 OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 5, p. 304-13, Dec 2001.
- 125 NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, p. 13-24, Jan-Feb 2011.
- 126 HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, n. 1, p. 12-8, Jan 2006.

- 127 SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 7, p. 3093-7, Apr 1993.
- 128 NATARO, J. P. et al. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 176, n. 15, p. 4691-9, Aug 1994.
- 129 NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**_CDC, v.4, n.2, Jun 1998.
- 130 WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 1, p. 4-8, Jan 2007.
- 131 VELARDE, J. J. et al. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 1123-35, Dec 2007.
- 132 ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J Clin Microbiol**, v.42, n.12, p.5849-53, Dec 2004.
- 133 MENARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n. 1, p. 43-60, Jul 2002.
- 134 HENDERSON, I. R. et al. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5587-96, Nov 1999.
- 135 BARROW, P. A. *Salmonella* control-past, present and future. **Avian Pathol**, v. 22, n. 4, p. 651-69, Dec 1993.
- 136 FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R. e ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 43, p.329-338.
- 137 BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* Nomenclature. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, Jul 2000.
- 138 CDC. **Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2003**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC 2004.
- 139 BOYLE, E. C. et al. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. **J Bacteriol**, v. 189, n. 5, p. 1489-95, Mar 2007.
- 140 CHIU, C. H.; SU, L. H.; CHU, C. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 2, p. 311-22, Apr 2004.

- 141 MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 6, p. 882-9, Mar 2010.
- 142 SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 7-15, Jan 2011.
- 143 DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of *salmonella* with the intestinal mucosa. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 3, p. 405-28, Jul 1999.
- 144 HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 8, p. 887-900, Aug 2011.
- 145 LAI, C. Y. et al. *Salmonella* gastroenteritis complicated with bacteremia and ruptured cholangitis in an infant with congenital choledochal cyst. **J Formos Med Assoc**, v. 106, n. 3 Suppl, p. S20-3, Mar 2007.
- 146 BOPP, C. A. et al. *Escherichia*, *Salmonella* and *Shigella* identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J., et al (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM Press, 2003. p.654-671.
- 147 WATTIAU, P.; BOLAND, C.; BERTRAND, S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 22, p. 7877-85, Nov 2011.
- 148 ALVAREZ, J. et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 4, p. 1734-8, Apr 2004.
- 149 KIM, S. et al. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p. 3608-15, Oct 2006.
- 150 HONG, Y. et al. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 178, Oct 2008.
- 151 LEADER, B. T. et al. High-throughput molecular determination of *Salmonella enterica* serovars by use of multiplex PCR and capillary electrophoresis analysis. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 1290-9, Mar 2009.
- 152 BARCO, L. et al. *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping. **Int J Food Microbiol**, v. 163, n. 2-3, p. 193-203, May 2013.
- 153 SABAT, A. J. et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveill**, v. 18, n. 4, p. 20380, Jan 2013.

- 154 BARRETT, T. J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathog Dis**, v. 3, n. 1, p. 20-31, Sep 2006.
- 155 MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, Dec 2005.
- 156 FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 430-40, Jul 2009.
- 157 PNL05, C. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **PNL05 Last Updated April 2013**, 2013. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-Shigella-Salmonella-pfge-protocol-508c.pdf> >. Acesso em: 10 Dec 2015.
- 158 ROSS, I. L.; YOUNG, C. C.; HEUZENROEDER, M. W. New options for rapid typing of *Salmonella enterica* serovars for outbreak investigation. In: KUMAR, Y. (Ed.). **Salmonella - A Diversified Superbug**: InTech, 2012. cap. 26, p.523-541.
- 159 ROSS, I. L.; HEUZENROEDER, M. W. Discrimination within phenotypically closely related definitive types of *Salmonella enterica* serovar typhimurium by the multiple amplification of phage locus typing technique. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 4, p. 1604-11, Apr 2005.
- 160 ROSS, I. L.; HEUZENROEDER, W. M. A comparison of two PCR-based typing methods with pulsed-field gel electrophoresis in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Int J Med Microbiol**, v. 299, p. 410-420, Feb 2009.
- 161 DE TONI, F. et al. A prospective study on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Paraná State, Brazil. **Lett Appl Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 645-647, Feb 2009.
- 162 TOZETTO, S. M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella enterica* no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- 163 PR, L. Mapa de Capacitação GAL nas Regionais - Laboratório Central do Estado do Paraná - **LACEN/PR**. Curitiba, 2016. Disponível em: <<http://www.lacensaude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=70>>. Acesso em: 05 Jun 2016.

- 164 FARAH, S. M. et al. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Parana State, southern Brazil. **Lett Appl Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 607-12, Jun 2007.
- 165 IRINO, K. et al. Subtilase cytotoxin-encoding subAB operon found exclusively among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 988-90, Mar 2010.
- 166 OLSVIK, O.; STROCKBINE, N. A. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga like toxin genes in *Escherichia coli*. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F., et al (Ed.). **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Washington, D.C: American Society for Microbiology 1993. p.271-276.
- 167 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. 2. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 168 ROSS, I. L.; PARKINSON, I. H.; HEUZENROEDER, M. W. The use of MAPLT and MLVA analyses of phenotypically closely related isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Int J Med Microbiol**, v. 299, n. 1, p. 37-41, Jan 2009.
- 169 AFSET, J. E. et al. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p. 3703-11, Oct 2006.
- 170 MÜLLER, D. et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 10, p. 3380-90, Mar 2007.
- 171 PATON, A. W.; PATON, J. C. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2944-7, Jun 2005.
- 172 ARANDA, K. R. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol Lett**, v. 267, n. 2, p. 145-50, Feb 2007.
- 173 SCHMIDT, H. et al. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 69, n. 11, p. 6863-73, Nov 2001.
- 174 CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**. Document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, p.1-165, 2011.

- 175 FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas por PCR-Multiplex**. 2008. 106.f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- 176 RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis**, v. 3, n. 1, p. 59-67, Sep 2006.
- 177 HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 11, p. 2465-6, Nov 1988.
- 178 GOERING, R. V. Pulsed-field gel electrophoresis. In: PERSING, D. H., F.C.; VERSALOVIC, J., et al (Ed.). **Molecular microbiology diagnostic principles and practice**. 1. Washington, DC: ASM Press, 2004. cap. 15, p.185-196.
- 179 TENOVER, F. C. Bacterial strain typing through the decades: a personal reflection. In: PERSING, D. H.; TENOVER, F. C., et al (Ed.). **Molecular microbiology diagnostic principles and practice**. 1. Washington, DC: ASM Press, 2004. cap. 14, p.183-184.
- 180 EFSA; ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. **EFSA J**, Atlanta, Georgia, v. 13, n. 1, p. 3991, 2015. Disponível em: < www.efsa.europa.eu/efsajournal >. Acesso em: 20 Jan 2016.
- 181 FERNANDES, S. A. et al. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-84, Jul-Aug 2006.
- 182 JACKSON, B. R. et al. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 8, p. 1239-44, Aug 2013.
- 183 HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R. V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiol Infect**, v. 129, n. 1, p. 1-8, Aug 2002.
- 184 CDC. **National *Salmonella* Surveillance Annual Report, 2012**. US Department of Health and Human Services (CDC). Atlanta, Georgia, p.1-12. 2014.
- 185 KE, B. et al. Serovar distribution, antimicrobial resistance profiles, and PFGE typing of *Salmonella enterica* strains isolated from 2007–2012 in Guangdong, China. **BMC Infect Dis**, v. 14, n. 1, p. 338, Jun 2014.

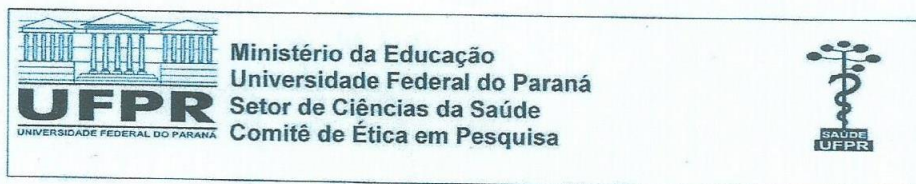
- 186 OZDEMIR, K.; ACAR, S. Plasmid Profile and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Salmonella enterica* Isolates from Humans in Turkey. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 95976, May 2014.
- 187 SOUZA, R. B. et al. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. **Braz. J. Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 497-500, Jun 2010.
- 188 GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **Int J Food Microbiol**, v. 130, n. 2, p. 77-87, Mar 2009.
- 189 RANIERI, M. L. et al. Comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization for *Salmonella* serovar prediction. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 1786-97, Jun 2013.
- 190 YOUNG, C. C.; ROSS, I. L.; HEUZENROEDER, M. W. A new methodology for differentiation and typing of closely related *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates. **Curr Microbiol**, v. 65, n. 5, p. 481-7, Nov 2012.
- 191 THONG, K. L. et al. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 1070-4, May 1995.
- 192 NGOI, S. T.; THONG, K. L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and animals in Malaysia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, n. 4, p. 304-11, Dec 2013.
- 193 PANG, J. C. et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. **J Appl Microbiol** v. 99, n. 6, p. 1472-1483, Oct 2005.
- 194 GATTO, A. et al. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and S. Typhimurium definitive phage type 104 in nine European countries, 2000–2004: results of an international multi-centre study. **Epidemiol Infect**, v. 134, n. 4, p. 729-36, Aug 2006.
- 195 MARAGKOUidakis, S. et al. Empiric antimicrobial therapy and infectious diarrhea. Do we need local guidelines? **Eur J Intern Med**, v. 22, n. 5, p. e60-2, Oct 2011.
- 196 DINIZ-SANTOS, D. R. et al. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 77-83, Feb 2005.

- 197 RUGELES, L. C. et al. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. **Int J Food Microbiol**, v. 138, n. 3, p. 282-6, Apr 2010.
- 198 ELIAS, W. P. et al. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol Infect**, v. 129, n. 1, p. 49-55, Aug 2002.
- 199 REGUA-MANGIA, A. H. et al. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 4, p. 414-22, Apr 2009.
- 200 TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 6, p. 320-329, Jun 2010.
- 201 ASLANI, M. M. et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. e136-9, Feb 2011.
- 202 ZAMBONI, A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 1058-63, Marc 2004.
- 203 MOON, J. Y.; PARK, J. H.; KIM, Y. B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 253, n. 2, p. 215-20, Dec 2005.
- 204 BOISEN, N. et al. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 2, p. 294-301, Feb 2009.
- 205 MAKUBE, C. et al. Molecular characterization of virulence factors in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates from children in Nairobi, Kenya. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 8, p. 598-604, Aug 2012.
- 206 SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J Clin Invest**, v. 87, n. 4, p. 1450-5, Apr 1991.
- 207 YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infect Immun**, v. 64, n. 4, p. 1441-5, Apr 1996.
- 208 PAIVA DE SOUSA, C.; DUBREUIL, J. D. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Int J Med Microbiol**, v. 291, n. 1, p. 15-20, Apr 2001.

- 209 LOPES, L. M. et al. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 4, p. 1968-72, Apr 2005.
- 210 SILVA, L. E. et al. Detection and genetic analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (EAST1) gene in clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 135, May 2014.
- 211 VIEIRA, M. A. et al. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 1452-5, Apr 2010.
- 212 LIEBCHEN, A. et al. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in São Paulo, Brazil: identification of intermediate virulence factor profiles by multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 6, p. 2274-8, Jun 2011.
- 213 MORABITO, S. et al. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3343-8, Jun 2003.
- 214 ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, n. 4, p. 357-65, Aug 2009.
- 215 GARCIA, P. G.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **J Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 46-52, Feb 2011.
- 216 DIAS, R. C. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. **APMIS**, p. 1-10, Jan 2016.
- 217 OCHOA, T. J. et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, n. 2, p. 296-301, Aug 2009.
- 218 ALIKHANI, M. Y. et al. Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. **Iran J Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 42-7, 2013.
- 219 HIEN, B. T. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 996-1004, Jun 2008.

- 220 SOUZA, T. B. et al. High prevalence of antimicrobial drug-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* in asymptomatic children living in an urban slum. **J Infect**, v. 59, n. 4, p. 247-51, Oct 2009.

ANEXO 1



Curitiba, 07 de outubro de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Cyntia M.F. Fadel-Picheth

Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que a solicitação de continuidade da pesquisa intitulada **"Bactérias causadoras de diarreia"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em 07 de outubro de 2009.

Registro CEP/SD: 320.SM.102.06.12 CAAE: 0053.0.000.091-06

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 07/04/2010.

Atenciosamente

Profa. Dra. Liliانا Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Setor de Ciências da Saúde

Prof. Dra. Liliانا Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - Setor de Ciências da Saúde - UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – CEP: 80060-240
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br